



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Larbi Tébessi –Tébessa.



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie appliquée

**MÉMOIRE DE MASTER**

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie

**Filière** : Sciences Biologiques

**Spécialité** : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Thème :**

**Étude de la séroprévalence de l'infection à  
*Brucella* spp. chez l'espèce ovine dans la  
région de Tébessa**

**Présenté par :**

**MEBARKI Naouel**

**LAIFA Sakina**

**Devant le jury :**

<b>M<sup>me</sup> SMAILI S</b>	<b>MCB</b>	<b>Présidente</b>	<b>Université de Tébessa</b>
<b>M<sup>me</sup> FENGHOUR H</b>	<b>MCB</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>Université de Tébessa</b>
<b>M. BELAKEHAL A</b>	<b>MAA</b>	<b>Promoteur</b>	<b>Université de Tébessa</b>

**Date de soutenance : 19 Juin 2019**



## ملخص

داء الحمى المالطية هو مرض متنقل يصيب الإنسان والحيوان؛ شديد العدوى وهو أحد أهم الأمراض الحيوانية المنشأ في جميع أنحاء العالم، ويُعرف بأنه مرض مهني. يسبب الإجهاد وقلة الخصوبة عند الثدييات المصابة.

من بين التقنيات المستخدمة لتشخيص داء الحمى المالطية، إختبار بنفسجي البنغال Rose Bengale (EAT)، وهو إختبار حساس للغاية وضعيف التخصص؛ يكتشف العدوى في وقت مبكر، لهذا يجب أن يُكَمَّل هذا الإختبار بإختبار آخر أكثر تحديدًا مثل إختبار ELISA غير المباشر.

أجريت دراسة عرضية خلال فترة ثلاث سنوات (2016؛ 2017 و 2018) في ولاية تبسة - شرق الجزائر. كان هدفنا هو تقييم إنتشار الأجسام المضادة لبكتيريا البروسيلات (*Brucella spp.*) في الأغنام؛ لتحديد إرتباط بعض عوامل الخطر المفترضة بإيجابية المصلية الفردية و أيضا لمقارنة نتائج هذا الإختبار بنتائج إختبار ELISA أجري على نفس العينات.

تم أخذ 376 عينة من رؤوس الأغنام موزعة على 39 قطيعًا. كان الانتشار المصلي الفردي ( 43.88 % )، 38 من أصل 39 قطيع تحتوي على الأقل نتيجة واحدة إيجابية. مقارنة نتائج الإختبارين أظهرت مستوى تطابق ضعيف جدا ( $kappa=0.015$ ).

هذه الدراسة تؤكد وجود أجسام مضادة ضد البروسيلات في منطقة تبسة. أفضل وسيلة للسيطرة هي وقائية، بناءً على نتائج الكشف الفردي للحيوان يتم التخلص من الحيوان المصاب بعد التأكد من النتيجة بإختبار آخر وتلقيح الحيوان السليم. الإرشاد والتوعية لهم دور هام للوقاية من خلال التحسيس والحث على اتخاذ تدابير النظافة الشخصية، والإمتناع عن إستهلاك منتجات الألبان غير المبسترة ومجهولة المصدر.

الكلمات المفتاحية: بروسيلا spp., الاغنام , روز البنغال، إلها ، تبسة.

## Abstract

Brucellosis is a mobile disease that affects humans and animals; it is highly contagious and is one of the most important zoonotic diseases around the world and is defined as a professional disease. Causes miscarriage and low fertility in infected mammals.

Among the techniques used for the diagnosis of Maltese fever, the Rose Bengal Test (EAT), a highly sensitive and highly specialized test, detects infection early, so this test should be supplemented by another more specific test such as the indirect ELISA test.

A cross-sectional study was carried out over a period of three years (2016; 2017 and 2018) in the state of Tebessa - eastern Algeria. Our aim was to assess the prevalence of antibodies to *Brucella* spp. In sheep; to determine the association of certain risk factors with positive individual serotonin and also to compare the results of this test with ELISA test results on the same samples.

376 samples of sheep heads were distributed to 39 herds. Individual seropositivity (43.88%), 38 out of 39 herd, contained at least one positive result. Comparison of the results of the two tests showed a very weak match ( $\kappa = 0.015$ ).

This study confirms the presence of antibodies against *Brucella* in the area of Tebessa. The best means of control is preventive, based on the results of the individual detection of the animal is disposed of the infected animal after confirmation of the result by another test and vaccinate the healthy animal. Counseling and awareness-raising plays an important role for prevention by sensitizing and encouraging personal hygiene measures and abstaining from consumption of unrefined and unrefined dairy products.

**Keywords:** *Brucella* spp., sheep, Rose Bengal, ELISA, Tebessa.

## Résumé

La Brucellose est une anthroponose très contagieuse et l'une des zoonoses majeures les plus répandues dans le monde, reconnue comme maladie professionnelle. Elle provoque des avortements et l'infertilité chez les ruminants infectés.

Parmi les techniques utilisées pour le diagnostic de la brucellose, on a le test de Rose Bengale (EAT), qui est un test très sensible et peu spécifique permet de détecter précocement l'infection, mais cette épreuve doit donc être complétée par un autre test plus spécifique comme le test ELISA indirect.

Une étude transversale a été réalisée durant la période de 3 ans (2016, 2017 et 2018) dans la wilaya de Tébessa ; pour estimer le taux de présence des anticorps anti-*Brucella* spp. chez l'espèce ovine, à évaluer une éventuelle association entre la séropositivité individuelle avec certains facteurs de risque putatifs et pour mesurer la concordance entre les résultats obtenus par ce test à celle obtenu par le test ELISA. 39 troupeaux englobant 376 ovins ont été échantillonnés ; les sérums échantillonnés ont été testés par le test de Rose Bengale pour dépister les anticorps anti-*Brucella* spp.

La séroprévalence individuelle était de (43.88%), et 38 troupeaux parmi les 39 échantillonnés ont au moins un cas séropositif. Le coefficient Kappa a montré une concordance médiocre ( $K=0.015$ ) entre les résultats obtenus par les deux tests.

Cette étude a mis en évidence l'existence des anticorps anti-*Brucella* spp. chez l'espèce ovine, dans la région de Tébessa. Cela confirme à la fois, que le programme de lutte mis en place contre la brucellose en Algérie, au moins au niveau de la wilaya d'étude, n'était pas suffisamment efficace, et qu'une grande partie du cheptel était encore atteint. Le dépistage des cas brucelliques devrait être très difficile à établir à l'aide d'un test peu coûteux comme le Rose Bengale.

La meilleure méthode de lutte est préventive ; en premier lieu le dépistage et l'abattage systématique d'un animal séropositif après une confirmation avec un test plus spécifique, avec la vaccination de l'animal sain. La vulgarisation et la sensibilisation des citoyens pour prendre les mesures hygiéniques, et d'éviter la consommation des produits laitiers non pasteurisés et d'origine inconnu.

**Mots clés :** *Brucella* spp., Ovine, Rose Bengale, ELISA, Tébessa.

## *Remerciement*

### *Remerciements*

*Tout d'abord, on tient à remercier le bon Dieu le tout Puissant de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.*

*Nous voulons avant tout exprimer notre gratitude à notre encadreur M. BELAKEHAL A pour avoir accepté de nous encadrer, dans cette étude. Nous la remercions pour ses précieux conseils et toute l'attention qu'il nous avons accordées son implication, son soutien, et ses encouragements au long de ce mémoire.*

*Aux membres du jury :*

*Présidente : SMAILI Sawsen*

*Examinatrice : FENGHOUR Hind*

*Vous nous faites un grand honneur*

*en acceptant de juger ce travail.*

*Enfin, Nous remercions à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de cette mémoire.*

## *Dédicace*

### *Dédicace*

*Aujourd'hui et après toutes ces années, j'ai l'honneur, mais surtout le plaisir de dédier ce travail à toutes les personnes qui m'aiment, qui croient en moi et me donne des raisons de devenir meilleure :*

#### *A ma mère*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur tu es une source inépuisable de tendresse, de patience. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.*

*Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. Puisse dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

#### *A mon père*

*Tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme, En témoignage de brut des années de sacrifices, d'encouragement et de prières. Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de tous vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un des tes rêves. Puisse dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.*

*Aucun mot, aucune phrase ne peut exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération que je porte pour vous. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

## *Dédicace*

### *A mes sœurs : Nada, Loudjain*

*A mon deuxième moi, le plus beau cadeau de ma vie, à la personne qui embellie mes jours, joie de vivre, sourire, raison, courage, et surtout vos diversité était une inspiration inépuisable pour moi. Un très grand merci d'avoir toujours était à mes côtés, de m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles de ma vie, merci pour vos conseils raisonnables et courageux. Je vous dédis chères sœurs ce travail en guise de gratitude et de remerciement, je n'oublierais jamais vos encouragements et vos soutiens le long de mes études, sans vous il n'aurait pas vue le jour, que dieu puisse vous procurer un avenir prospère et plein de succès.*

### *A mes frères : Hasni, Mohamed Ali*

*Vous êtes un cadeau du ciel. Quoique je dise, je ne saurais exprimer l'amour et la tendresse que j'ai pour vous. Je vous remercie, pour votre support, vos dévouements et indéfectible soutien, et je vous dédie ce travail pour tous les moments qu'on a pu partager ensemble. Je ne saurais traduire sur papier l'affection que j'ai pour vous. J'espère que vous trouverez dans cette thèse l'expression de mon affection pour vous.*

*Puisse dieu le tous puissant vous préserver du mal, vous combler de sante et de bonheur.*



## *Dédicace*

*A mes tantes et oncles, leurs époux et épouses, mes cousins, mes  
cousines surtout NABILA et toute la famille*

*Que ce travail soit le témoin de toute mon affection et mon  
attachement.*

*A mon binôme : Laifa Sakina, et mes amis : Bouakal Khaoula, Limami  
Meriem, Merah Moufida, Mesbahi Samra, Si said Nabila, Djedouani  
Hakim.*

*Nous avons partagé les bons et les mauvais moments durant toute la  
période d'étude, puisse notre amitié durée éternellement. Toutes les  
expressions aussi descriptibles qu'elles soient, ne pourraient témoigner  
l'affection et les sentiments de l'amour que je vous porte.*

*Cette dédicace ne serait complète sans une pensée pour toutes mes  
connaissances et pour les personnes qui m'ont apporté leurs aides et qui  
ont ainsi contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

*M·NAOUEL*

## *Dédicace*

*Par la grâce de DIEU, et merci à Dieu nous a donné la force de  
continuer.*

### *À la mémoire de ma grand-mère*

*Ton absence m'attriste, tu me manques beaucoup.*

*Toi que nous aimons tant... tu vis toujours dans nos cœurs et tu  
resteras à jamais dans nos mémoires... Que dieu t'accueille dans son vaste  
paradis*

*je dédie ce travail aux êtres les plus chers au monde*

### *À Mes parents*

*Les mots me manquent pour remercier sincèrement pour ton amour,  
sacrifices et tout ce que vous avez fait pour notre éducation. Que DIEU  
donne une longue vie en pleine santé.*

### *À ma belle-sœur*

*Roumaïssa pour toute la joie, amour et amitié*

### *À mes frères*

*Ali et Mohammed Baha Eddine pour leur amour et soutien permanent*

### *À ma copine*

*Le meilleur et le plus cool jamais Dalia*

*À toute la famille LAIFA et TALBI*

*À tous les amis*

*L. Sakina*

## Liste des Tableaux

<b>Table 1:</b> Les différentes espèces (nomspecies) et biovars du genre <i>Brucella</i> . Leurs caractéristiques épidémiologiques et leurs pouvoirs pathogènes chez l'homme .....	<b>5</b>
<b>Table 2:</b> Analyse statistique des facteurs de risque (Test de khi-deux).....	<b>38</b>
<b>Table 3:</b> Tableau contingence pour les résultats de deux tests .....	<b>38</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> Représentation de la structure du LPS de type lisse et du LPS de type rugueux (KDO:2-KETO-3DEOXY-OCTANOATE).....	6
<b>Figure 2:</b> Localisation géographique et organisation administrative de la wilaya de Tébessa.....	26
<b>Figure 3:</b> Coagulation de sang et décantation de sérum .....	28
<b>Figure 4:</b> Réactif de Rose Bengale .....	29
<b>Figure 5:</b> Sérum positif et sérum négatif .....	30
<b>Figure 6 :</b> Taux de séroprévalence individuelle (A) et taux de troupeau infecté (B) ...	32
<b>Figure 7:</b> Distribution de taux de séropositivité en fonction de survenue d'avortement en dernière gestation .....	32
<b>Figure 8:</b> Distribution de taux de séropositivité en fonction de catégorie de parité. ..	33
<b>Figure 9:</b> Distribution de taux de séropositivité en fonction de la présence de chèvre .....	34
<b>Figure 10:</b> Distribution de taux de séropositivité en fonction de taille de troupeau ...	35
<b>Figure 11:</b> Distribution de taux de séropositivité en fonction de sexe.....	35
<b>Figure 12:</b> Distribution de taux de séropositivité en fonction d'année.....	36
<b>Figure 13 :</b> Distribution géographique et taux de séropositivité au niveau de chaque troupeau .....	37

## Liste des Abréviations et Symboles

### Liste des Abréviations et Symboles

<b>Th1</b> : Helper de Type 1	<b>FAO</b> : Food and Agriculture Organisation
<b>TLR4</b> : Récepteur toll-like receptor 4	<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé
<b>FcR</b> : Récepteur Fc	<b>OIE</b> : Organisation Internationale des Epizooties
<b>Cr3</b> : Complement receptor 3	<b>CO<sub>2</sub></b> : Dioxyde de carbone
<b>BCV</b> : <i>Brucella</i> -containing vacuoles	<b>B</b> : <i>Brucella</i>
<b>IgM</b> : Immunoglobuline M	<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique
<b>IgG</b> : Immunoglobuline G	<b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique
<b>IgA</b> : Immunoglobuline A	<b>ARNr</b> : Acide Ribonucléique ribosomal
<b>EAT</b> : Epreuve de l'antigène tamponné	<b>RecA</b> : Protéine d' <i>Escherichia coli</i> A
<b>ELISA</b> : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay	<b>PCR</b> : Polymérase Chain Réaction
<b>R</b> : Rough	<b>SNP</b> : Polymorphisme nucléotidique simple
<b>S</b> : Smooth	<b>RFLP</b> : restriction fragment length polymorphism
<b>FC</b> : Fixation du Complément	<b>LPS</b> : Lipopolysaccharide
<b>IFN<math>\gamma</math></b> : Interféron $\gamma$	<b>UV</b> : Ultra violet
<b>PAMPs</b> : Pathogen-Associated Molecular Patterns	<b>pH</b> : Acidité
<b>IL-12</b> : Interleukine-12	<b>RER</b> : Réticulum Endoplasmique Rugueux
<b>UFC</b> : unité formant colonie	<b>T CD4+</b> : lymphocyte T Cluster de différenciation 4+
<b>HSR</b> : Hyper sensibilité retardée	<b>CD8+</b> : Cluster de différenciation 8+
<b>ECA</b> : épreuve cutanée allergique	<b>CMH</b> : Complexes Majeurs d'histocompatibilité
<b>RT</b> : Ring test	
<b>RBT</b> : Rose Bengal test	
<b>TCR</b> : T cell receptor	
<b>g</b> : gramme (s)	
<b>h</b> : heure (s)	

# Sommaire

## Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Remerciements

Dédicace

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction ..... 1

### Partie Bibliographique

2.....1. Historique.....

2. Définition.....2

3. Étiologie.....3

3.1. Présentation générale.....3

3.2. Classification.....4

3.3. Propriétés biologiques.....7

4. Pathogénicité.....7

4.1. Réceptivité et sensibilité.....8

4.2. Virulence.....8

4.3. Déroulement de l'infection.....10

4.4. L'IMMUNITE.....11

4.4.1. Réaction inflammatoire.....11

4.4.2. Internalisation des bactéries..... 12

4.4.3. Les BCV..... 13

5. Epidémiologie.....13

6. Tableau clinique chez l'animal.....15

7. Diagnostic.....17

7.1. Diagnostic clinique.....17

7.2. Diagnostic expérimental.....17

7.2.1. Examen direct..... 17

7.2.2. Examen indirect..... 19

8. Prophylaxie.....22

8.1. Méthodes de surveillance et de lutte.....22

### Partie expérimentale

1. Matériel et Méthodes.....25

1.1. Présentation générale de la région d'étude.....25

1.2. Échantillonnage et prélèvements sanguins.....27

1.1.1. Période d'étude..... 27

## Sommaire

1.1.2. La taille d'échantillon.....	27
1.1.3. Animaux .....	27
1.1.4. Prélèvements sanguins .....	27
1.3. Test sérologique.....	28
1.3.1. Description et principe .....	28
1.3.2. Réactif.....	29
1.3.3. Matériel nécessaire .....	29
1.3.4. Mode opératoire .....	29
1.3.5. Précautions.....	29
1.3.6. Interprétation des résultats .....	30
1.4. Récolte et analyse des données.....	30
1.4.1. Calculs des taux de séroprévalence et des intervalles de confiance .....	30
1.4.2. Test <i>Kappa</i> .....	31
2. Résultats.....	31
2.1. Prévalence individuelle apparente.....	31
2.2. Taux de troupeau infecté.....	31
2.3. Les facteurs de risque associés à la présence des Anticorps anti- <i>Brucella</i> spp.....	32
2.3.1. Facteur d'avortement.....	32
2.3.2. Facteur de catégorie de parité .....	32
2.3.3. Présence de chèvre.....	33
2.3.4. Taille de Troupeau .....	34
2.3.5. Facteur de sexe.....	35
2.3.6. Facteur année (2016 /2017/ 2018) .....	36
2.3.7. Facteur taux d'avortement .....	36
2.4. L'analyse statistique (Test de Khi-deux).....	37
2.5. Comparaison de résultats (coefficient <i>Kappa</i> ).....	38
3. Discussion.....	39
Conclusion.....	40
Références bibliographiques.....	41

## *Introduction*

### **Introduction**

La brucellose est l'une des zoonoses les plus contagieuses, commune à de nombreuses espèces animales et à l'homme ; c'est une anthroponose à une déclaration obligatoire due à des bactéries appartenant au genre *Brucella* spp. Elle est l'une des premières maladies identifiées et peut être présente depuis des siècles. En Algérie depuis le début du 19<sup>ème</sup> siècle ; jusqu'à aujourd'hui, elle continue à se propager dans nos élevages et se présente comme une maladie de la reproduction (avortement spontané) ; provoquant de lourdes pertes économiques (30).

Le diagnostic de laboratoire est indispensable face à la faible spécificité du diagnostic clinique ; il existe deux types de diagnostic, direct (Polymérase chaîne réaction "PCR" et le diagnostic bactériologique) et indirect. Le Diagnostic indirect repose sur la détection ou l'augmentation du titre des anticorps spécifique ; les tests de diagnostic indirect utilisés dans le diagnostic de la brucellose sont nombreuses, les plus utilisés sont : Sérodiagnostic de Wright (SW), ELISA et Réaction à l'antigène tamponnée ou test de Rose Bengale (EAT) ; ce dernier reste un test peu coûteux et applicable sur un grand échelle, basé sur une réaction simple, rapide, sensible et spécifique d'agglutination sur lame en milieu acide tamponné (43).

En Algérie, plusieurs études ont été menées pour évaluer la propagation de cette bactérie dans notre cheptel (4) (17) (41), ou bien pour identifier génétiquement les isolats trouvés en Algérie (30).

Cette étude a été réalisée pour, d'une part (i) dépister la présence des anticorps anti-*Brucella* spp. dans des sérums ovine dans la région de Tébessa, via l'utilisation de test Rose Bengale ; ainsi pour évaluer une éventuelle association statistique entre la séropositivité individuelle et certains facteurs de risque ; et d'autre part (ii) de comparer les résultats obtenus dans cette étude avec celle réalisée sur les mêmes échantillons via la technique ELISA, afin de mesurer l'accord entre les deux tests.



## ***Partie Bibliographie***

### **1. Historique**

La brucellose est l'une des premières maladies identifiées et peut être présente depuis des siècles. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1861 sur l'île de Malte par un médecin Anglais nommé Marston (34).

En 1887, le colonel David Bruce, médecin de l'armée royal, isolé l'agent causal pour la première fois. L'organisme a été détecté dans la rate de soldats britanniques sur l'île de Malte et, par conséquent, la maladie était connue sous le nom de fièvre de Malte, L'organisme s'appelait initialement *Micrococcus melitensis* (9).

Le premier cas documenté de Brucellose chez les animaux a été signalé chez les bovins en Danemark. L'agent responsable s'appelait *Bacillus abortus* a ensuite été isolé en 1895 par Bernhard Bang, ce qui lui a valu le nom de maladie de Bang's (6). En 1905, Zamitt en voulant étudier la maladie sur le modèle animal de la chèvre découvrit qu'elles étaient tous positives au test de Wright (61).

Evans, (1918) un bactériologiste américain, a démontré une très grande ressemblance étroite entre *Micrococcus melitensis* identifié par David Bruce et *Bacillus abortus* isolés par Bernhard Bang. Elle a constaté que les caractères morphologiques, culturels, biochimiques et sérologiques de *Bacillus abortus* et de la fièvre de Malte étaient les mêmes. Elle a suggéré que les deux pourraient être classés dans le genre *Bacteraceae* (15).

### **2. Définition :**

La Brucellose est une anthroponose très contagieuse, reconnue comme maladie professionnelle. Elle classée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Office Internationale des Epizootie (OIE) comme l'une des zoonoses majeurs les plus répandue dans le monde (33); c'est une maladie à déclaration obligatoire connue sous plusieurs noms, notamment "maladie de Corps", "fièvre méditerranéenne", "fièvre ondulante", "fièvre de Malte", "fièvre de Gibraltar" (chez l'Homme); avortement contagieux, fièvre abortive, avortement infectieux, avortement épizootique, épидидymite contagieuse du bélier (Chez les animaux) (1).

La maladie a une menace sérieuse de la santé publique dans le monde ; en particulier dans les pays en voie de développement de l'Asie centrale, l'Afrique, l'Amérique de sud et les régions méditerranéens (40). Elle provoque des avortements

## ***Partie Bibliographie***

et infertilité chez les mammifères infectés. L'agent pathogène peut se transmettre à l'homme par l'ingestion de lait non pasteurisé, produits laitiers ou bien via le contact avec un animal infecté (13).

Chez l'espèce humaine ; l'incidence mondiale de la maladie est estimée à 500.000 cas/an (46). La brucellose humaine est une maladie d'expression clinique polymorphe ; les symptômes sont souvent communs et peuvent être confondus avec une maladie courante comme le rhume. Les personnes atteintes de brucellose peuvent avoir des périodes de fièvre, avec frissons et sudation. Ces symptômes peuvent être accompagnés de maux de tête, de faiblesse et de perte d'appétit ; une enflure glandulaire et de la douleur articulaire peuvent également se manifester (55) (2).

### **3. Étiologie**

*Brucella* spp. est l'agent responsable de la brucellose, est une bactérie intracellulaire de l'homme et des animaux et peuvent généralement être trouvés dans les systèmes réticulo-endothéliaux et reproducteurs.

#### **3.1. Présentation générale**

Les *Brucella* sont des coccobacilles de petite taille mesurant de 0,6 à 1,5 µm de long et 0,5 à 0,7 µm de large. Ces bactéries sont immobiles, non capsulées, Gram négatif et non sporulées (26).

Ces bactéries peuvent être révélées par des colorations électives comme la coloration de Stampé, mettant en évidence les bactéries acido-alcool-résistantes grâce à leur paroi riche en lipides. Ces méthodes sont peu spécifiques et colorent aussi les *Chlamydomphila* et les *Coxiella* qui possèdent les mêmes affinités tinctoriales que les *Brucella*, et sont également responsables d'avortements chez les ruminants. La culture doit alors être mise en place pour faire le diagnostic différentiel de l'agent pathogène lors d'avortements (21) (22).

Les *Brucella* sont des bactéries nutritionnellement exigeantes de culture lente, principalement aérobies strictes à métabolisme respiratoire strict, et possèdent généralement une oxydase (36). Leur croissance nécessite des milieux enrichis à base de sang et certaines espèces exigent une atmosphère avec 5 à 10% de CO<sub>2</sub>. Leur température idéale de croissance est de 34°C.

## *Partie Bibliographie*

### **3.2. Classification**

Les bactéries du genre *Brucella* font partie de la classe des  $\alpha$ 2-*Proteobacteria*, de l'ordre des *Rhizobiales* et de la famille des *Brucellaceae* (24). Ce genre a été établi en 1920 par Meyer et Shaw, avec à l'époque deux espèces décelées, *B. melitensis* chez l'homme et chez la chèvre, et *B. abortus* chez les bovins. Suite à leurs études, ils ont conclu que l'agent pathogène responsable de la fièvre ondulante chez l'homme ne pouvait pas être différencié morphologiquement ou biochimiquement de l'agent pathogène responsable d'avortements chez les animaux domestiques. Par la suite, d'autres espèces ont été détectées et ajoutées à ce genre : *B. suis* en 1929 chez le porc, *B. ovis* en 1956 chez les ovins, *B. neotomae* en 1957 isolé chez un petit rongeur de régions désertiques, et *B. canis* isolé chez les canidés en 1968. Toutes ces espèces ont été classées d'après leur phénotype et leur hôte de prédilection.

En 1968, de nouvelles méthodes moléculaires ont pu confirmer que les espèces *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* appartenaient bien au même genre. De plus, cette étude a montré que l'agent pathogène responsable d'avortements chez les Beagles appartenait également à ce genre et a alors été dénommé *B. canis*. Par la suite, l'apparition de méthodes moléculaires de plus en plus sophistiquées a permis de confirmer que ces espèces étaient génétiquement très proches les unes des autres. Elles ont toutes en commun le même ARN ribosomal 16S, une séquence génétique nommée *recA* et sont très proches sur le reste de leur ADN.

En 2007, *B. pinnipedialis* et *B. ceti* ont été ajoutées, isolées respectivement chez les phoques et chez les cétacés. En 2008, *B. microti* a été isolée chez un campagnol, suivie en 2010 de *B. inopinata* identifiée suite à une infection sur une prothèse mammaire chez une patiente de 71 ans. Ces deux dernières espèces diffèrent des autres par leur phénotype. *B. microti* possède toutefois le même ARNr 16 S et le gène *recA*, alors que *B. inopinata* diffère seulement de cinq nucléotides au niveau de son ARNr 16S et de sept nucléotides au niveau de son gène *recA*. Cependant, même si *B. inopinata* est l'espèce divergeant le plus génétiquement, elle possède tout de même une similitude supérieure à 80% avec *B. melitensis* (54) (60).

Sur le plan taxonomique, le genre *Brucella* a été divisé en dix espèces, elles-mêmes séparées en biovars, en fonction notamment d'une relative spécificité de l'hôte animal naturel (36) ; les biovars ne se différencient que par leur propriété in vitro, biochimique, phénotypique et antigénique, et non par leur pouvoir pathogène (45). Les espèces les plus communes chez nos animaux domestiques sont *Brucella abortus*,

## Partie Bibliographie

*B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*. Concernant les espèces sauvages, on retrouve *B. microti* et *B. neotomae* chez les rongeurs, et *B. ceti* et *B. pinnipedialis* chez les mammifères marins (**Tableau. 1**).

La différenciation des espèces de *Brucella* relève de laboratoires spécialisés grâce aux caractères cultureux, métaboliques et à la sensibilité aux phages et aux colorants.

**Table 1: Les différentes espèces (nomspecies) et biovars du genre *Brucella*. Leurs caractéristiques épidémiologiques et leurs pouvoirs pathogènes chez l'homme**

Espèce	Biovars	Répartition géographique principale	Hôte animal habituel	Pathogénicité chez l'homme
<i>B. abortus</i>	1 à 6. Et 9	Ubiquitaire	Bovins. Ongulés sauvages	Modérée
<i>B. melitensis</i>	1 à 3	bassin méditerranéen, moyen orient	Ovins, caprins, ongulés sauvages	Forte
<i>B. suis</i>	1 et 3	Amérique, Asie, Océanie	Suidés	Forte
<i>B. suis</i>	2	Europe centrale et occidentale	Suidés et lièvres	Faible <sup>a</sup>
<i>B. suis</i>	4	Amérique du Nord,	Rennes	Modérée
<i>B. suis</i>	5	Russie Russie	Rongeurs sauvages	Forte
<i>B. canis</i>		Ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du sud)	Chiens	Faible
<i>B. ovis</i>		Bassin méditerranéen	Ovins	Nulle
<i>B. neotomae</i>		Utah (états unis)	Rats du désert	Non connue
<i>B. cetaceae</i>		Non connue	Cétacés (dauphins)	Non connue
<i>B. pinnipediae</i>		Non connue	Pinnipèdes (phoques, otaries)	Non connue <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Rares cas d'infections humaines rapportés dans la littérature (30).

<sup>b</sup> Deux cas probables d'infection humaine. Rapportés chez des patients péruviens émigrés récemment aux états unis, et présentant une atteinte neurologique, et comme facteurs de risque une consommation régulière de fromages frais et de fruits de mer crus (4).

Les *Brucella* sont étroitement proches sur le plan génétique les unes des autres, leurs séquences génétiques possèdent plus de 90% de similitudes (10) (23). Mais il est tout de même possible de les différencier grâce à des tests biochimiques simples impliquant l'oxydase, l'uréase, et grâce à des méthodes moléculaires comme

## Partie Bibliographie

la Polymérase Chain Réaction (PCR) par analyse du polymorphisme nucléotidique simple (SNP), par typage par séquençage multiple de gènes ou par l'analyse multi-locus de séquences.

L'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments obtenus par restriction après une amplification par PCR (ou "restriction fragment length polymorphism- PCR" (RFLP-PCR)) permet d'identifier *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* et *B. suis*. Les mini-satellites polymorphes présents dans le génome sont également utilisés pour différencier les isolats, et sont très utiles dans le cas de foyers épidémiques. L'apparition du séquençage entier du génome permet de mieux comprendre l'évolution des espèces (54).

Certaines *Brucella* se différencient également par leur lipopolysaccharide (LPS). En effet, chez les *Brucella*, il se présente sous deux formes (Figure 1) :

- Une forme incomplète dépourvue de chaînes O, appelée LPS en phase Rought. Il est retrouvé chez *Brucella ovis* et *Brucella canis*. Leurs colonies présentent un aspect rugueux (rough). Ces deux espèces possèdent un antigène R, responsable des réactions antigéniques croisées, notamment avec *Bordetella bronchiseptica* et certaines souches de *Pasteurella multocida*.
- Une forme complète avec des chaînes O, appelée LPS en phase Smooth. Il est retrouvé chez *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*. Leurs colonies présentent alors un aspect lisse (smooth) (38). Ces bactéries expriment des antigènes A et M responsables également de réactions croisées.

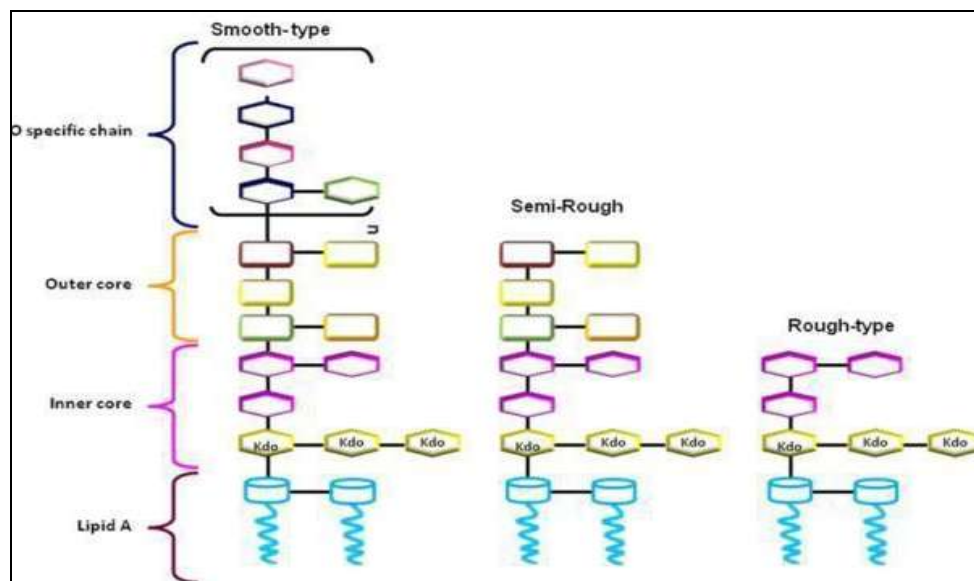


Figure 1: Représentation de la structure du LPS de type lisse et du LPS de type rugueux (KDO:2-KETO-3DEOXY-OCTANOATE) (49).

## ***Partie Bibliographie***

La différenciation des biovars se fait par distinction de leurs caractéristiques comme le besoin en dioxyde de carbone, la production de sulfure d'hydrogène, les affinités tinctoriales et le profil d'agglutination par les sérums monospécifiques anti-A et anti-M, par exemple (19). Les 3 biovars de *B. melitensis* ont des caractéristiques phénotypiques identiques sauf pour leur profil d'agglutination avec les sérums mono spécifiques anti-A et anti-M, qui est spécifique de chacun d'eux. Leur sensibilité exclusive au phage permet de les différencier des autres espèces de *Brucella* (21).

### **3.3. Propriétés biologiques**

Les *Brucella* sont des bactéries strictes des mammifères. Chaque espèce a un ou plusieurs hôtes de prédilection, mais leur spécificité d'hôtes est très large. Par exemple, *Brucella melitensis* affecte majoritairement les ovins et les caprins mais peut également infecter les bovins, les ongulés de la faune sauvage et l'homme. Il peut donc y avoir un passage entre deux espèces animales différentes mais pas toujours dans les deux sens.

Les *Brucella* sont sensibles aux agents physico-chimiques tels que les rayons UV, les désinfectants, les antiseptiques et l'acidification mais résistent aux ammoniums quaternaires. La décontamination par la chaleur reste la plus efficace.

Les *Brucella* sont détruites en une heure à 60°C et par la pasteurisation. Dans des conditions favorables de pH (supérieur à 4), de basses températures et dans la matière organique, les *Brucella* peuvent survivre plusieurs mois (19). Par contre, dans la viande la survie des *Brucella* est courte, ainsi la contamination humaine à partir de carcasses est très rare (21). Ces bactéries survivent plus longtemps dans le fromage de vache que dans le fromage de chèvre et survivent peu dans le lait caillé, le beurre et les fromages fermentés affinés plus de trois mois (12).

Les pâtures restent contaminées plusieurs mois. Elles peuvent être mises en cultures pour éviter que les bovins y pâturent, ou un épandage de cyanamide calcique peut être réalisé pour les assainir.

## **4. Pathogénicité**

*B. melitensis* est plus pathogène que *B. abortus* pour les ovins et les caprins mais aucune différence de pathogénicité entre les différents biovars de *B. melitensis* n'a été mise en évidence à ce jour.

## ***Partie Bibliographie***

### **4.1. Réceptivité et sensibilité**

Les ovins présentent une sensibilité variable à *B. melitensis* selon les races (27). La sensibilité est également individu dépendante. Ainsi pour cette espèce, tous les types de situation peuvent être rencontrés, de l'infection aigüe avec avortement à la résistance totale, ainsi que des formes chroniques (21).

Chez les bovins, l'animal jeune pré-pubère est réceptif mais sa sensibilité à l'infection est nulle, la maladie ne s'exprimant que très rarement à cet âge-là. L'animal jeune développe seulement une réaction sérologique discrète et transitoire. Dix pour cent des veaux nés de mères infectées semblent devenir porteurs latents (3). La sensibilité maximale est atteinte lorsque les organes génitaux sont complètement développés (18) (19). Les animaux les plus sensibles restent les femelles gestantes.

### **4.2. Virulence**

Les *Brucella* possèdent un développement intracellulaire facultatif. Elles ont mis en place des mécanismes de défenses leur permettant de contourner la réponse immunitaire de l'hôte. L'infection peut se faire par les muqueuses. Les bactéries envahissent alors les cellules épithéliales comme les cellules M des plaques de Peyer (47). Ainsi, les *Brucella* peuvent entrer par les voies digestives ou respiratoires. Une fois dans l'organisme, elles peuvent survivre dans n'importe quelle cellule. Elles échappent à la phagocytose par les macrophages dans lesquels elles se multiplient sans provoquer leur destruction. En effet, elles empêchent la fusion phagolysosomiale et peuvent inhiber l'apoptose des macrophages et se diriger vers un compartiment du réticulum endoplasmique rugueux (RER) propice à la réplication des *Brucella*.

Les *Brucella*, notamment *B. abortus*, possèdent un fort tropisme pour les cellules trophoblastiques dans lesquelles elles se multiplient intensément. Cette multiplication dans les cellules trophoblastiques dépend du stade de gestation. En effet, la réplication de ces bactéries est plus intense lors de stades avancés de la gestation dans les trophoblastes qui sécrètent alors plus d'hormones stéroïdiennes. Les *Brucella* perturbent alors la production hormonale en augmentant la sécrétion des hormones stéroïdiennes et en modulant le métabolisme des précurseurs des prostaglandines. Au niveau du placenta infecté, le taux de prostaglandines produites augmente, le taux de progestérone diminue et les taux d'oestrogène et de cortisol augmentent comme lors d'une mise-bas. Ces modifications pourraient jouer un rôle dans le mécanisme de l'avortement (45).

## ***Partie Bibliographie***

L'érythritol, un alcool à quatre carbones présent naturellement dans les eaux fœtales des ruminants, serait une source privilégiée de carbone pour les *Brucella*, favorisant ainsi leur croissance au niveau de l'utérus (47) (52). Ces bactéries entraînent alors des ulcères de l'endomètre, des placentite et la destruction des villosités, causant la mort et l'expulsion du fœtus. Ces bacilles colonisent également les cotylédons, le chorion, les poumons du fœtus et les fluides fœtaux au cours du dernier tiers de gestation chez les ruminants. Le fœtus expulsé présente souvent des lésions de pleuropneumonie (10).

L'internalisation des *Brucella* dans les cellules de l'organisme est possible grâce aux protéines bactériennes BvrR et BvrS. Celles-ci permettent l'expression de protéines de la membrane externe qui facilitent l'internalisation des bactéries par modification du cytosquelette de la cellule hôte (10). L'invasion par la muqueuse digestive n'entraîne pas de réaction inflammatoire. Les *Brucella* présentent des mécanismes inhibant l'activation du système immunitaire, la sécrétion des cytokines ainsi que la présentation des antigènes.

Le LPS, malgré son activité endotoxinique relativement faible, joue un rôle important. Il prévient l'action du complément et permet une résistance contre les peptides antimicrobiens comme les défensines et les lactoferrines (47). En effet, les *Brucella* possèdent une enveloppe hydrophobe constituée de nombreuses molécules peu chargées négativement. Or les substances bactéricides utilisées par l'hôte pour se défendre sont chargées positivement et se lient généralement aux enveloppes chargées négativement. Ces molécules ne se lient alors pas aux *Brucella* qui ne sont donc pas sensibles à ce mécanisme de défense (35).

Les *Brucella* ne possèdent pas des facteurs de virulence classiques comme une capsule, des fimbriae ou des exotoxines (55).

Le système de sécrétion de type IV codé dans l'opéron virB est indispensable pour la survie des bactéries dans le milieu intracellulaire (47). En effet, les *Brucella* ont besoin pour survivre et se multiplier d'un milieu acide qui permet l'expression de l'opéron virB (43). Mais contrairement aux autres systèmes de type IV exprimés habituellement en milieu extracellulaire, ici l'expression de l'opéron virB se fait spécifiquement dans le macrophage. Il permet la neutralisation du pH du phagosome et ainsi d'autres gènes de la bactérie s'expriment afin de modifier la structure et d'empêcher la maturation et la fusion du phagosome avec le lysosome (45). Cette



## ***Partie Bibliographie***

fusion est également empêchée par le glucane cyclique  $\beta$ -1,2, protéine de la membrane externe (10).

Les mécanismes de virulence des *Brucella* ne sont pas encore tous connus.

### **4.3. Déroulement de l'infection**

L'infection par les *Brucella* se décompose en deux périodes : la période primaire, qui correspond à l'infection aiguë, et la période secondaire, qui correspond à l'infection chronique. La contamination peut se faire par voie cutanée, surtout si la peau est lésée, ou par les muqueuses, notamment l'oropharynx, la conjonctive, les voies respiratoires supérieures, la voie orale et la voie vaginale. Les bactéries sont alors phagocytées puis véhiculées par voie lymphatique jusqu'aux nœuds lymphatiques drainant le territoire d'entrée où elles se multiplient dans les macrophages. Elles sont ensuite disséminées par voie lymphatique et sanguine vers des localisations secondaires alors que l'animal ne présente aucun symptôme, avec une bactériémie rarement décelable.

Les *Brucella* sont ainsi disséminées en différents lieux et se multiplient dans des sites d'élection :

- ❖ Le système réticulo-endothélial, notamment la rate, les nœuds lymphatiques et le foie, tout en continuant leur multiplication intra-macrophagique,
- ❖ L'appareil génital mâle, les testicules et leurs annexes, ainsi que l'appareil génital femelle, notamment l'utérus gravide, plus précisément au niveau du placenta mais également la mamelle où elles sont excrétées dans le lait,
- ❖ Les articulations, les bourses séreuses et synoviales.

Ainsi en fonction du lieu de multiplication de la bactérie, différents tableaux cliniques peuvent être observés comme des avortements, des orchites, des arthrites... (18).

Lors d'une infection, plusieurs situations peuvent se présenter :

- ❖ Une guérison avec élimination des bactéries si l'animal possède un bon système immunitaire,
- ❖ L'établissement d'une infection chronique, avec des signes cliniques associés,
- ❖ Une infection latente, fréquemment rencontrée chez la vache, avec persistance de bactéries dans les macrophages dans les nœuds lymphatiques particulièrement ceux de l'appareil génital et de la mamelle procurant ainsi la possibilité de réactivation après plusieurs années.

## ***Partie Bibliographie***

Les *Brucella* se multiplient au niveau de l'espace utéro-chorial provoquant une placentite exsudative et nécrotique (45). Ceci entraîne un décollement utéro-chorial et la formation d'adhérences fibreuses entre le placenta et l'utérus. Si ces lésions sont étendues, les échanges nutritifs entre la mère et le fœtus sont arrêtés et celui-ci meurt d'anoxie, déclenchant l'avortement. Les *Brucella* peuvent également passer dans le liquide amniotique. Dans ce cas, le fœtus les ingère provoquant une septicémie et la mort du fœtus, et donc un avortement. Si les lésions placentaires sont peu étendues, le fœtus peut survivre et naître à terme ou prématurément. Mais souvent, le nouveau-né souffre de lésions cérébrales dues à une hypoxie, provoquant sa mort dans les 48h après la naissance. De plus, les adhérences entre le placenta et l'utérus sont responsables de rétentions placentaires. L'avortement peut survenir quelques semaines à quelques mois après l'infection pendant la gestation (18).

Les femelles nées en milieu infecté avortent généralement moins que les autres. Ainsi, dans les élevages où la brucellose évolue depuis un certain temps, le taux d'avortement est plus faible que dans les élevages récemment infectés (19).

### **4.4. L'IMMUNITÉ**

Les cellules épithéliales constituent la principale porte d'entrée des *Brucella* dans l'organisme, mais le mécanisme d'invasion n'a pas encore été clarifié. Les *Brucella* sont ensuite détectées puis phagocytées par les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques, qui appartiennent à l'immunité innée.

Les macrophages et les cellules dendritiques internalisent puis fragmentent l'agent pathogène afin de présenter ses antigènes aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ via les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). S'en suivent une réaction inflammatoire et une prolifération des clones de cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques de l'antigène. La production de cytokines T helper de type 1 (Th1) est induite par les antigènes des *Brucella*. Cependant, celles-ci sont capables de perturber de la réponse des lymphocytes Th1 (56).

#### **4.4.1. Réaction inflammatoire**

Lors de l'entrée d'une bactérie dans un organisme, une réaction inflammatoire se met en place avec production de facteurs de l'inflammation et recrutement de cellules de l'immunité. Dans le cas des *Brucella*, cette réaction est faiblement induite. En effet, contrairement aux autres bactéries intracellulaires, l'entrée de ces bactéries dans les cellules épithéliales, les macrophages ou les cellules dendritiques n'entraîne

## ***Partie Bibliographie***

pas d'altérations cellulaires. Aucune réaction inflammatoire n'est alors déclenchée (51).

De plus, le LPS des *Brucella* induit une faible réponse inflammatoire et une faible activation du récepteur toll-like receptor 4 (TLR4), contrairement aux LPS des autres bactéries Gram négatives. La production de facteurs pro-inflammatoires et l'activation du complément sont faibles. Aucun regroupement massif de neutrophiles n'est observé au niveau du site d'inoculation, du fait de la faible production de facteurs de pro-inflammatoires (56) (44).

### **4.4.2. Internalisation des bactéries**

Les bactéries sont généralement phagocytées par les cellules de l'immunité innée. Elles sont ensuite conduites jusqu'aux lysosomes par l'intermédiaire de vacuoles, où elles sont détruites et fragmentées.

Dans le cas des macrophages, la *Brucella* se lie à leur membrane cytoplasmique via différents récepteurs tels que le FcR et le Cr3. La bactérie est ensuite ingérée grâce à un système de phagocytose de type « fermeture à glissières ». Ce mécanisme nécessite l'intervention des microfilaments d'actine et des lipides membranaires (35). Les chaînes O du LPS lisse des *Brucella* interagissent avec les lipides de la membrane cytoplasmique des macrophages. Ce phénomène permet l'internalisation des bactéries et la formation de vacuoles contenant les *Brucella* (BCV : Brucella-containing vacuoles). A ce stade environ 90% des bactéries meurent mais quelques-unes survivent dans les BCV.

L'autophagie des bactéries intracellulaires est habituellement déclenchée par plusieurs éléments : leur internalisation, l'activation des récepteurs TLR et la sécrétion d'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) par les lymphocytes T Th1. Les TLR détectent de nombreux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns) comme le LPS, les lipoprotéines et les acides nucléiques. Ils activent alors la transcription de facteurs nucléaires, de protéines activatrices et de facteurs régulateurs d'IFN. Ce phénomène induit la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules stimulatrices. Cependant, concernant les *Brucella*, les TLR et les lymphocytes Th1 sont faiblement activés. La production des facteurs de l'inflammation est donc faiblement induite.

Il semblerait également que le récepteur TLR 9 associé à l'adaptateur MyD88 ait un rôle important dans la résistance de l'hôte à la brucellose. En effet, il est requis

## ***Partie Bibliographie***

dans l'élimination de *B. abortus* et de *B. melitensis* dans les macrophages et les cellules dendritiques. Le récepteur TLR 9 est intracellulaire, exprimé au niveau des endosomes et des lysosomes. Il est capable de détecter les ADN bactériens riches en motifs CpG entraînant la production d'interleukine-12 (IL-12), qui déclenche la réponse immunitaire par les lymphocytes T Th1 (56).

### **4.4.3. Les BCV**

Les *Brucella* ont mis en place de nombreux mécanismes de défenses permettant de contrôler le mouvement des BCV et d'inhiber leur fusion avec le lysosome. Ainsi, l'apoptose des macrophages et la maturation des cellules dendritiques sont inhibées, prolongeant la durée de vie de ces cellules (35).

L'objectif des *Brucella* est de se multiplier en assez grand nombre dans les BCV. L'acidification de ces vacuoles est permise par leur interaction avec les lysosomes et le réticulum endoplasmique. Cette modification de pH permet de déclencher la réplication intensive des bactéries (35).

Les *Brucella* possèdent la capacité de minimiser la fusion des BCV avec les lysosomes. Ceci réduit leur exposition aux facteurs bactéricides présents dans ce compartiment. Le  $\beta$ -glucane cyclique cité précédemment intervient dans ce phénomène.

Le LPS permet également d'empêcher la fusion des vacuoles avec le lysosome. En effet, les LPS libérés dans le milieu intracellulaire forment des micelles qui interagissent avec la membrane des BCV et modifient leur structure moléculaire. Cette nouvelle composition ne permet alors pas leur fusion avec le lysosome (35). De plus, le LPS des *Brucella* est difficilement dégradable par les macrophages. Il forme alors des complexes avec les CMH-II réduisant leur activité.

## **5. Epidémiologie**

La transmission entre animaux peut être directe, de manière horizontale et verticale, ou indirecte à partir de l'environnement.

Lorsqu'il n'y a pas d'avortement, la contamination verticale peut se faire in utero ou lors du passage du nouveau-né dans la filière pelvienne. La contamination peut aussi se faire par ingestion du colostrum et du lait contaminé (14). En général, l'animal jeune se débarrasse de la bactérie. Cependant, chez certains veaux nés de mères infectées, l'infection peut persister mais sans déclencher de réponse

## ***Partie Bibliographie***

sérologique, qui n'apparaîtra alors que chez les femelles lors de leur première gestation **(18)**.

La transmission horizontale peut être directe par contact entre individus sains et individus infectés excréteurs, lors d'une cohabitation ou de la reproduction. Elle peut être indirecte par l'intermédiaires des bâtiments, des pâtures, du matériel, de l'aliment ou encore de l'eau, contaminés par des matières virulentes **(18)**.

La contamination d'un cheptel indemne se fait le plus souvent par l'introduction d'un animal infecté inapparent, par contamination de voisinage ou pendant la transhumance, à l'origine du mélange de troupeaux de provenance variée, ce qui constitue un facteur de risque considérable **(28)**.

Lorsqu'un troupeau est atteint, l'un des premiers signes d'appel est l'augmentation des avortements. Les saisons suivantes, le nombre d'avortements diminue. Le type d'élevage influence l'évolution de la maladie. Le confinement des animaux, le mélange des classes d'âge et le taux de rotation important sont des facteurs favorisant la dissémination de la bactérie.

Tout animal infecté, qu'il présente des symptômes de brucellose ou non, est une source potentielle de contamination pendant toute sa vie. De nombreux animaux sont porteurs latents et excréteurs **(20)**. Leur contagiosité est variable au cours du temps, souvent intermittente et dépend beaucoup du stade physiologique de l'animal. En effet, elle est plus élevée pendant la période de reproduction et surtout autour de la période de mise-bas. Les sources majeures de contamination pour toutes les espèces sensibles sont les produits de mises-bas ou d'avortements brucelliques, qui contiennent une quantité importante de *Brucella*. Ainsi, les eaux fœtales et le placenta peuvent contenir entre 10<sup>9</sup> à 10<sup>10</sup> UFC/g (unité formant colonie) alors que la dose contaminante est estimée à 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> UFC **(45)**. Cette excrétion très importante dure plusieurs semaines chez les petits ruminants, et deux à trois semaines chez les bovins **(18)**.

L'urine peut également constituer une matière virulente en se contaminant avec les sécrétions utérines et vaginales chez les femelles infectées en période de mise bas.

La contamination par voie respiratoire ou oculaire se fait par les aérosols et les poussières contaminés. La contamination orale, très fréquente, se fait par léchage des avortons ou des nouveau-nés, des placentas et des zones corporelles souillées. Fréquemment chez la brebis et la chèvre, l'infection persiste dans la mamelle et les

## ***Partie Bibliographie***

nœuds lymphatiques rétro mammaires et au niveau de la sphère génitale, se traduisant par une excrétion intermittente ou continue de *Brucella* dans le lait, avec pour conséquence la contamination du jeune lors de la prise du colostrum et du lait (19). Les nouveau-nés contaminés par le lait, semblent se débarrasser des *Brucella* avant l'âge adulte, surtout les agneaux, mais pour ceux qui demeurent porteurs latents, l'infection reste inapparente, même sérologiquement.

En ce qui concerne les mâles, leur rôle épidémiologique semble faible, mais ils servent de vecteurs mécaniques lorsque la monte naturelle est pratiquée (21). Lorsqu'ils sont atteints d'orchite et d'épididymite, le sperme peut être contaminé par des bactéries augmentant le risque de transmission lors de monte naturelle ou d'insémination artificielle (18).

Les chiens autour des troupeaux ont également un rôle car ils se contaminent facilement par ingestion des produits d'avortement et sont des vecteurs mécaniques puisqu'ils déplacent les produits d'avortement et de mise bas (21) (14).

### **6. Tableau clinique chez l'animal**

Il existe fréquemment des infections inapparentes, surtout chez les mâles, notamment chez le bélier, mais aussi chez la chèvre pour *Brucella melitensis*. Ces porteurs asymptomatiques sont excréteurs sans qu'il y ait toujours une séroconversion.

Une espèce de *Brucella* donnée est plus virulente chez son hôte de prédilection que les autres espèces. Au contraire, ces dernières vont plutôt provoquer des infections latentes avec localisation des bactéries dans le système réticulo-endothélial et la mamelle.

La brucellose peut être d'évolution aiguë à chronique avec différentes formes. Souvent elle se caractérise par des avortements, une baisse de la production laitière et des stérilités chez la femelle. La période primaire de l'infection se traduit différemment selon le sexe et le stade physiologique, comme les avortements chez les femelles gestantes. Les symptômes vont traduire la localisation de la multiplication bactérienne, comme les arthrites et les orchites.

Tout d'abord, des formes génitales sont fréquemment observées, comme des avortements avec rétention placentaire chez la vache pour *Brucella abortus*, chez la brebis pour *B. melitensis*, et chez la chienne pour *B. canis*. Parfois, il y a une faible

## ***Partie Bibliographie***

multiplication ou une multiplication tardive des bactéries en fonction du mois de gestation entraînant des lésions limitées.

*B. melitensis* provoque chez les petits ruminants des problèmes de reproduction avec des avortements ou la naissance de petits chétifs (23). Les caprins présentent plus souvent des formes inapparentes que les ovins. Cette bactérie entraîne chez les femelles des petits ruminants, des avortements souvent à partir du troisième mois de gestation, avec des zones d'œdème et de nécrose au niveau du placenta, ainsi qu'un exsudat brun-rougeâtre entre l'allantochorion et l'endomètre. Au niveau macroscopique, une nécrose est retrouvée à l'intérieur et autour des placentomes. Au niveau microscopique, des *Brucella* sont retrouvées dans les cytoplasmes des cellules des zones atteintes. On retrouve des cellules trophoblastiques desquamées, des macrophages, des neutrophiles et des plasmocytes dans les espaces entre les villosités chorioniques et les septa. Une endométrite est alors associée à la placentite. Les tissus lymphoïdes, la mamelle et les organes génitaux sont atteints par une inflammation granulomateuse non pathognomonique (21). Des stérilités temporaires sont à noter, touchant jusqu'à 10% du cheptel la première année.

Chez les petits ruminants, des mammites apparaissent avec la formation de nodules inflammatoires de la taille d'une noix ainsi que la production de grumeaux dans le lait. Chez la chèvre, l'excrétion mammaire des *Brucella* est souvent irrégulière mais intense (18).

Chez le mâle, *B. melitensis* peut provoquer des altérations épидидymo-testiculaires parfois palpables de type granulomateux ou nécrotique touchant parfois les vésicules séminales et la prostate, mais le plus souvent l'infection est inapparente (18) (21).

L'infection inapparente s'explique par le fait qu'il y a persistance de bactéries en position intracellulaire dans des sites électifs. Cette persistance dure jusqu'à l'âge adulte et est éventuellement découverte suite à un avortement chez la femelle après une possible réactivation. Dans tous les cas, autant dans celui d'une mise bas apparemment normale que dans le cas d'un avortement, il y a émission massive de *Brucella* dans le milieu extérieur, source de contamination pour les personnes gravitant autour des animaux infectés, éleveurs et vétérinaires en particulier.

Des métrites sont également observées chez la truie pour *Brucella suis*, ainsi que des infertilités chez la chienne et le chien pour *B. canis*, des orchites chez le

## ***Partie Bibliographie***

taureau pour *B. abortus* et des épидидymites chez le bélier pour *B. ovis* et le chien pour *B. canis*.

La période secondaire correspond à la disparition des *Brucella* ou plus fréquemment à leur persistance dans les nœuds lymphatiques notamment les nœuds lymphatiques céphaliques, rétro-mammaires ou iliaques. Une réactivation est alors possible, mais les femelles, en général, n'avortent qu'une seule fois. Lors des gestations suivantes, il n'y a pas forcément d'avortement mais une excréation importante de *Brucella* lors du part dans les produits de la mise-bas. Les petits sont alors chétifs et deviennent des porteurs latents et excréteurs persistants. La production de lait est diminuée et le lait est de mauvaise qualité (18).

La persistance de la bactérie dans les articulations provoque la formation d'hygromas ou d'arthrites chroniques (18).

## **7. Diagnostic**

### **7.1. Diagnostic clinique**

La suspicion de la brucellose doit se faire dès qu'il y a une flambée des avortements dans un troupeau. L'orchite ou l'épididymite chez le mâle forment également un signal d'alerte, tout comme la mort d'un veau dans les 48 h après la naissance présentant des symptômes d'anoxie et un taux élevé des rétentions placentaires (18).

Aucun de ces symptômes n'est pathognomonique et les examens complémentaires sont donc indispensables (21) (25).

### **7.2. Diagnostic expérimental**

Le diagnostic peut se faire de manière directe ou indirecte. Les anticorps sont parfois décelables chez un bovin pubère à partir de 30 jours après infection, et perdurent toute la vie de l'animal (18).

Le test diagnostique utilisé doit tenir compte de la situation épidémiologique. En effet, dans les zones en phase finale de l'éradication de la maladie, des tests très spécifiques doivent être utilisés (32).

#### **7.2.1. Examen direct**

Pour l'examen direct, le placenta, les sécrétions vaginales et le lait sont les principaux prélèvements utilisés en fonction des signes cliniques. Cependant, l'avorton en entier, s'il est petit, peut également être utilisé. S'il est déjà de grande



## ***Partie Bibliographie***

taille, son contenu stomacal, ses poumons et sa rate peuvent suffire. Néanmoins, l'avorton est souvent contaminé par la flore de l'environnement. Couramment, un écouvillon du col de l'utérus est réalisé. Sur les carcasses, on peut prélever les testicules en cas d'orchite chez le mâle, la rate et les nœuds lymphatiques. Tous les prélèvements doivent être effectués de façon stérile, et placés dans des récipients hermétiques stériles.

- La coloration de Stamp se fait sur frottis ou sur des calques d'organes ou de produits d'avortement, suivie d'un examen microscopique. Son coût est faible et sa réalisation est rapide, mais cette technique est peu sensible et peu spécifique. En effet, les *Chlamydomphila*, les *Rickettsiales* et *Coxiella burnetii* ont les mêmes affinités tinctoriales que les *Brucella* (22) (20).

- Le diagnostic de certitude est la mise en culture sur milieux solides sélectifs, l'isolement et l'identification du genre et de l'espèce de *Brucella*. Mais, souvent les prélèvements sont contaminés et d'autres bactéries se développent avant les *Brucella* dont la croissance est lente. Les milieux sélectifs utilisés sont complétés en antibiotiques pour inhiber la croissance des bactéries contaminantes et permettre uniquement la croissance des *Brucella*. Le milieu de Farrell est souvent utilisé (22). De plus, certains prélèvements sont plus pauvres en bactéries que d'autres, comme le lait, pour lequel une centrifugation peut alors être réalisée afin d'augmenter les chances de détection de la bactérie. En général, après deux à trois jours d'incubation, les colonies de *Brucella* commencent à être visibles. Après le quatrième jour d'incubation, les colonies font 1 à 2 mm de diamètre et leur surface est lisse ou rugueuse selon leurs propriétés (37). Cependant, il faut attendre 8 à 10 jours pour déclarer une culture comme négative en l'absence de colonies (26). Cette analyse doit être réalisée dans un laboratoire de biosécurité de niveau 3 du fait du caractère zoonotique de ces bactéries. L'identification de l'espèce de *Brucella* mise en évidence se fait grâce à de nombreux tests comme la catalase, l'oxydase, l'action des phages et l'agglutination par les sérums anti-M et anti-A pour déterminer toutes les caractéristiques de la souche en présence (25) (20). L'identification de l'espèce peut aussi se faire par PCR et séquençage après culture.

- A partir de cotylédons, de liquide d'arthrite, de lait, de sang ou de tissus, des tests de caractérisation par RFLP-PCR des *Brucella* peuvent être réalisés. Le prélèvement à tester est traité afin d'extraire l'ADN, qui est ensuite nettoyé par une

## ***Partie Bibliographie***

extraction au phénol. Cette méthode est à privilégier car elle est plus sécuritaire et plus rapide. De plus, ces tests permettent de déterminer l'espèce de *Brucella* en cause et le biovar concerné (26). Ils peuvent être effectués directement sur le prélèvement, ou à partir de colonies obtenus après une culture bactérienne. Cette technique est très sensible, elle peut être utilisée même si le prélèvement est contaminé, et détecte les bactéries mortes (23). Ce test est rapide mais devient vite onéreux s'il est utilisé pour tous les animaux d'un troupeau (22). Cette technique est très intéressante dans le cas d'un foyer de brucellose pour retrouver la source de l'infection, grâce à la détermination de l'espèce mais aussi du biovar en cause et de ses particularités génétiques (8).

### **7.2.2. Examen indirect**

L'examen indirect se fait par sérologie sur sang prélevé sur tube sec, sur le lait de mélange prélevé directement dans le tank, ou par test allergique.

L'examen indirect est un diagnostic sérologique permettant la mise en évidence d'anticorps anti-LPS. Il faut donc choisir un antigène de référence, soit un antigène du LPS en phase S pour le diagnostic des infections par *B. abortus*, *B. melitensis*, soit en phase R pour le diagnostic de *B. ovis* et *B. canis*. Cependant, les tests sérologiques ne permettent pas d'identifier l'espèce de *Brucella* qui est en jeu. Ils doivent être suivis d'un test direct en cas de positivité. On peut utiliser des tests qualitatifs d'agglutination rapide sur lame (épreuve à l'antigène tamponné : EAT) avec *B. abortus* ou *B. canis* comme antigène. On utilise également une réaction semi-quantitative de fixation du complément (FC) et un test qualitatif de type dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » : ELISA), utilisable pour des sérums de bovins uniquement. Ces deux dernières épreuves utilisent *B. abortus* comme antigène. Ces méthodes sont les plus utilisées, elles peuvent être mise en place aussi bien pour la détection de *B. abortus* que pour *B. melitensis* (22).

- L'EAT, appelée aussi Rose Bengale, est un test très sensible qui détecte précocement l'infection, mais peu spécifique, avec l'apparition de faux positifs. Cette méthode est efficace en cas de surveillance, car elle détecte très bien les troupeaux infectés. Néanmoins, les résultats sont parfois positifs pour des cheptels indemnes, cette épreuve doit donc être complétée par un autre test plus spécifique (31). L'EAT détecte les anticorps sériques dirigés contre le LPS, produits dès les premières phases

## ***Partie Bibliographie***

de l'infection, les anticorps IgM principalement, mais également les IgG1. Ils sont mis en évidence par interaction avec un antigène brucellique coloré au Rose de Bengale mis dans un milieu acide tamponné .

- La FC est moins sensible mais plus spécifique que l'EAT car elle présente moins de faux positifs, mais la détection de l'infection est plus tardive **(19)**. Elle détecte les anticorps fixant le complément produits lors de phases plus anciennes de la maladie notamment les IgG1.

La FC qui présente parfois des résultats faux négatifs sur des cheptels infectés, est moins sensible que l'EAT. Ces deux tests se contredisent parfois. Chez les cheptels fortement atteints, les animaux récemment infectés vont réagir positivement à l'EAT, mais négativement à la FC. En zone infectée, l'EAT est plus souvent utilisée, alors que dans les zones indemnes, l'EAT et la FC sont associées. L'utilisation des deux tests ensemble permet d'augmenter la sensibilité du dépistage et de détecter plus facilement les cheptels infectés.

- L'ELISA indirecte sur sérums est très sensible mais peu spécifique surtout dans les troupeaux vaccinés **(21)**. Elle peut s'effectuer sur sérum individuel ou sur mélange de dix sérums. Dans ce dernier cas, sa spécificité augmente tout en restant sensible. Elle peut également être utilisée sur le lait de mélange.

Le dépistage des animaux infectés latents repose sur la mise en évidence d'anticorps. Les tests sérologiques sur sérums sanguins manquent de spécificité, leur valeur prédictive positive est faible dans une zone indemne. Ils présentent parfois des réactions sérologiques faussement positives, anciennement appelées réactions « atypiques ». Celles-ci sont dues à des réactions antigéniques croisées entre les *Brucella* et d'autres bactéries. En effet, les tests sérologiques reposent sur la détection d'anticorps dirigés contre le LPS de type S des *Brucella*. Cependant, d'autres bactéries possèdent ce genre de LPS telles que *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O157 ou encore *Francisella tularensis*. Ainsi, si un animal est infecté par l'une de ces bactéries, il présentera une réaction positive aux tests sérologiques de dépistage de la brucellose **(38) (20)**. Les anticorps IgM sont le plus souvent impliqués dans ces réactions croisées **(43)**. Elles concernent souvent un faible nombre d'individus dans l'élevage, surtout les animaux jeunes, avec des titres sérologiques faibles. Elles disparaissent rapidement, en général en deux mois. Les anticorps impliqués sont labiles et avec le même échantillon de sang, il est parfois difficile de reproduire ces

## *Partie Bibliographie*

réactions. Elles sont le plus fréquemment retrouvées lors d'ELISA indirect sur sérums individuels, et plus souvent sur l'EAT que sur la FC. Ceci s'explique par le fait que l'EAT met en évidence les IgM et les IgG alors que la FC ne met en évidence que les IgG. Le taux de réactions sérologiques faussement positives varie d'une région à l'autre et d'une année sur l'autre.

- Le diagnostic différentiel de ces réactions sérologiques faussement positives peut être fait par recherche d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) à la brucelline. Cet extrait protéique purifié est obtenu à partir d'une *Brucella* en phase R dépourvu de LPS en phase S. Aucune production d'anticorps pouvant interférer avec le diagnostic sérologique et aucune réaction inflammatoire ne sont donc induites. Ce test s'appelle l'épreuve cutanée allergique (ECA). Il met en jeu la voie cellulaire de la réponse immunitaire.

Ce test est très sensible et très spécifique, sauf si l'animal a été vacciné auparavant, ou si l'infection est récente comme souvent lors d'avortements. Un délai de six semaines est à respecter entre deux ECA pour éviter toute interaction. Le facteur limitant pour ce test est la disponibilité de la brucelline.

- L'ELISA indirect sur mélange de lait constitue la méthode la plus spécifique et la plus sensible des méthodes de dépistage sur lait pour la brucellose chez les bovins. Ce test est à privilégier dans les zones indemnes. Si des résultats faussement positifs sont obtenus, il suffit en général d'attendre quelques semaines pour refaire les tests. Généralement, des résultats négatifs sont obtenus.

- Le ring test (RT) ou test de l'anneau, n'est utilisable que pour le lait de bovins. Il est cependant de moins en moins utilisé. Il s'agit d'une réaction d'agglutination qualitative obtenue par interaction des anticorps contenus dans le lait, les IgG1, IgM et surtout les IgA sécrétoires, dirigés contre le LPS bactérien, avec un antigène coloré par l'hématoxyline. Les agglutinats ainsi formés se lient aux globules gras qui remontent à la surface du lait formant ainsi un anneau coloré, si le test est positif (43). Le RT est utilisé pour confirmer un résultat douteux obtenu en ELISA (18). Cette méthode manque de sensibilité surtout lors d'infections récentes. La qualité du lait influe sur le résultat, comme avec le lait de mammite, le colostrum ou le lait de fin de lactation (7). Il est préférable d'utiliser ce test sur un mélange de lait issu de moins de 80 bovins, au-delà la sensibilité du test diminue du fait de la dilution (20). Le RT est moins sensible que l'ELISA indirect (59).

## ***Partie Bibliographie***

Mais selon la prévalence de la maladie dans une région, la valeur prédictive positive pour un test varie. Si la prévalence diminue, une augmentation du nombre de faux positifs est observée et donc une diminution de la valeur prédictive positive du test (3).

### **8. Prophylaxie**

#### **8.1. Méthodes de surveillance et de lutte**

Le traitement n'est pas recommandé, et il est à éviter en raison de son coût onéreux, des risques d'apparition de résistance et de l'absence de garantie de blanchiment de l'animal traité. La prophylaxie reste donc la seule lutte possible et repose sur des mesures sanitaires et médicales (62).

##### **8.1.1. Prophylaxie sanitaire**

La prophylaxie sanitaire se base sur les mesures offensives et défensives. Cependant, l'idéal consiste en l'assainissement des cheptels infectés et une protection des cheptels indemnes (50).

###### **8.1.1.1. Mesures offensives**

Les mesures offensives sont un ensemble de mesures visant à l'assainissement des exploitations infectées en appliquant l'isolement et l'abattage de tous les animaux présentant des signes de suspicion surtout les femelles ayant avortées et confirmées brucelliques, et tous les sujets porteurs d'hygroma. L'éradication de la brucellose doit tenir compte de plusieurs notions épidémiologiques essentielles comme la persistance possible de l'infection durant toute la vie du sujet brucellique, la réinfection possible des cheptels par l'intermédiaire de femelles nées de mères infectées, le rôle d'autres espèces dans le maintien de l'infection par un contrôle de toutes les espèces réceptives dans un élevage infecté telles que les chiens, le rôle de la transmission vénérienne d'où le recours à l'insémination artificielle, la transmission plus élevée lors de mise-bas ou avortement, etc.

Pour cela, il faut imposer un dépistage répétitif des animaux infectés (malades et infectés inapparents) ; leur isolement et leur élimination rapide vers la boucherie ; soustraire les jeunes femelles issues d'une mère infectée ; éliminer toute espèce connue brucellique ; détruire les placentas et autres matières virulentes ; désinfecter les locaux et matériels souillés ; traiter les fumiers ; etc. et les pâturages contaminés doivent être, en outre, considérés dangereux pendant au moins deux mois.

## ***Partie Bibliographie***

### **8.1.1.2. Mesures défensives**

Ces mesures sont indispensables pour les pays déjà infectés qui envisagent une lutte contre la brucellose et également pour les pays indemnes. Au niveau international, ces mesures défensives s'appliquent aux frontières des Etats et des transactions commerciales intéressant l'élevage et ses productions (48).

L'application de ces mesures exige de ne pas introduire des animaux en provenance de cheptels présentant des risques sanitaires, le maintien du cheptel à l'abri de contaminations de voisinage, l'hygiène de la reproduction, l'isolement des parturientes, la destruction des placentas et la désinfection périodique des locaux.

Dans les pays où la prévalence de la maladie est élevée, il faut commencer par une lutte individuelle (vaccination, assurance), pour aller progressivement vers une lutte collective (vaccination, éradication). L'objectif de la lutte est d'abord le contrôle par le maintien des coûts de la maladie à un niveau compatible avec la rentabilité économique puis par l'éradication afin d'éliminer l'infection brucellique d'une région.

### **8.1.2. Prophylaxie médicale**

Son objectif est de renforcer les moyens naturels de résistance des organismes sensibles. La prophylaxie médicale de la brucellose repose exclusivement sur l'utilisation des vaccins (58). Le vaccin anti brucellique idéal doit présenter quatre qualités fondamentales :

❖ L'innocuité c'est à dire l'inaptitude à provoquer la maladie (avortements) ou un portage de germes chez l'animal, ni une contamination de l'homme ;

❖ L'efficacité : le vaccin devrait réduire le taux d'infection. De ce point de vue, aucun vaccin n'est efficace à 100%. Les animaux qui échappent à la protection vaccinale continueront à entretenir l'infection ;

❖ La compatibilité : elle est basée sur la prophylaxie sanitaire, en particulier dans le dépistage sérologique de l'infection. Mais quel que soit le vaccin, même utilisé dans les meilleures conditions possibles, il y a toujours un délai post-vaccinal au cours duquel la sérologie est positive. Le diagnostic sérologique est donc impossible pendant cette période. Suivant les vaccins, ce délai est plus ou moins long ;

❖ La commodité d'emploi c'est-à-dire la stabilité, la présentation, le conditionnement mais aussi la durée de l'immunité conférée. Mais ces qualités ne sont d'ailleurs jamais rencontrées dans une même préparation. La vaccination est destinée aux bovins, ovins et caprins, car on ne dispose pas suffisamment

## ***Partie Bibliographie***

d'informations sur l'efficacité et l'innocuité des vaccins chez les autres espèces animales (16).

Pour les petits ruminants, une prophylaxie médicale est justifiée dans les régions fortement infectées où elle est la seule méthode de lutte économiquement utilisable. Elle peut aussi compléter la prophylaxie sanitaire quand le taux d'infection est élevé. Par contre, elle est à proscrire en région indemne ou peu infectée. Le vaccin le plus efficace est un vaccin à agent vivant préparé à partir de la souche **REV1** de *Brucella melitensis* qui a un pouvoir pathogène atténué pour les petits ruminants (5).

Son inoculation provoque une hyperthermie transitoire avec anorexie passagère et parfois une réaction inflammatoire au site d'inoculation. La souche persiste ensuite dans l'organisme. Mais, elle est labile en conditions naturelles et doit donc être conservée au réfrigérateur.

Une seule injection sous cutanée ou instillation conjonctivale aux jeunes femelles de 3-6 mois assure une protection pendant plusieurs années avec une réponse sérologique limitée qui n'empêche pas le dépistage sérologique de l'infection des adultes (48).

La dose classique en sous cutanée est de 10-20 milliards de bactéries : les anticorps persistent alors deux ans. Cette même dose injectée par voie conjonctivale entraîne une persistance des anticorps pendant seulement quatre 4 mois.

Il existe deux stratégies vaccinales :

❖ Vaccination systématique de tous les jeunes (3 à 6 mois) destinée à remplacer les animaux plus âgés du troupeau. C'est la meilleure stratégie pour limiter la diffusion de la maladie et éviter la contamination humaine.

❖ Vaccination généralisée avec élimination des animaux porteurs d'anticorps (29).

# **Partie expérimentale**



## **1. Matériel et Méthodes**

L'objectif de cette étude, d'une part (i) est d'estimer la séroprévalence des anticorps anti-*Brucella* spp. par l'utilisation de test de Rose Bengale chez l'espèce ovine dans la région de Tébessa et à identifier une éventuelle association entre la séropositivité avec certains facteurs de risque putatifs ; et d'autre part (ii) de comparer ces résultats avec celles de test ELISA effectuée sur les mêmes échantillons dans une étude précédente.

### **1.1. Présentation générale de la région d'étude**

La wilaya de Tébessa se situe au Nord-Est de l'Algérie ; s'étend sur une superficie de 13.878 km<sup>2</sup>, c'est une zone qui regroupe un vaste étendu steppique de notre pays en position de transit entre le Nord et le Sud, son altitude varie entre -1 et 1713m. Elle est limitée au Nord par la Wilaya de Souk-Ahras, au Sud par la Wilaya d'El Oued, à l'Ouest par les Wilayet d'Oum Elbouaghi et Khenchela et à l'Est par la république tunisienne sur une distance de 300 km de frontière. Sur le plan administratif, la wilaya compte 28 communes regroupées en 12 Daïras (**Figure 2**).

Cette région étant une zone de transition météorologique est considérée comme une zone agro-pastorale avec une présence d'un nombre important de phénomènes (gelée, grêle crue, vent violent). Elle se caractérise par un hiver froid avec faible pluviométrie, et un été chaud et humide (la température dépasse 40°C en juillet).

La superficie totale de la wilaya se divise en quatre zones homogènes du côté des données climatiques.

- ❖ La zone Subhumide (400 à 500 mm/an) très peu étendu, il couvre que quelques ilots limités aux sommets de quelque reliefs (une superficie de 135000 ha, soit 10% de la superficie totale).
- ❖ La zone Semi-aride (300 à 400 mm/an) représenté par les sous étages frais et froid, il couvre toute la partie Nord de la wilaya avec une superficie de 229450 ha.
- ❖ La zone Sub-Aride (200 à 300 mm/an) couvre les plateaux steppiques d'Oum-Ali, Safsaf-El-Ouesra, Thlidjene et Bir El-Ater, occupe environ 50% de la superficie totale de la wilaya.
- ❖ Et, la zone Aride ou saharien doux (-200 mm/an), commence et s'étend au-delà de L'Atlas saharien et couvre les plateaux de Negrine et Ferkane, soit une superficie de 202457 ha.

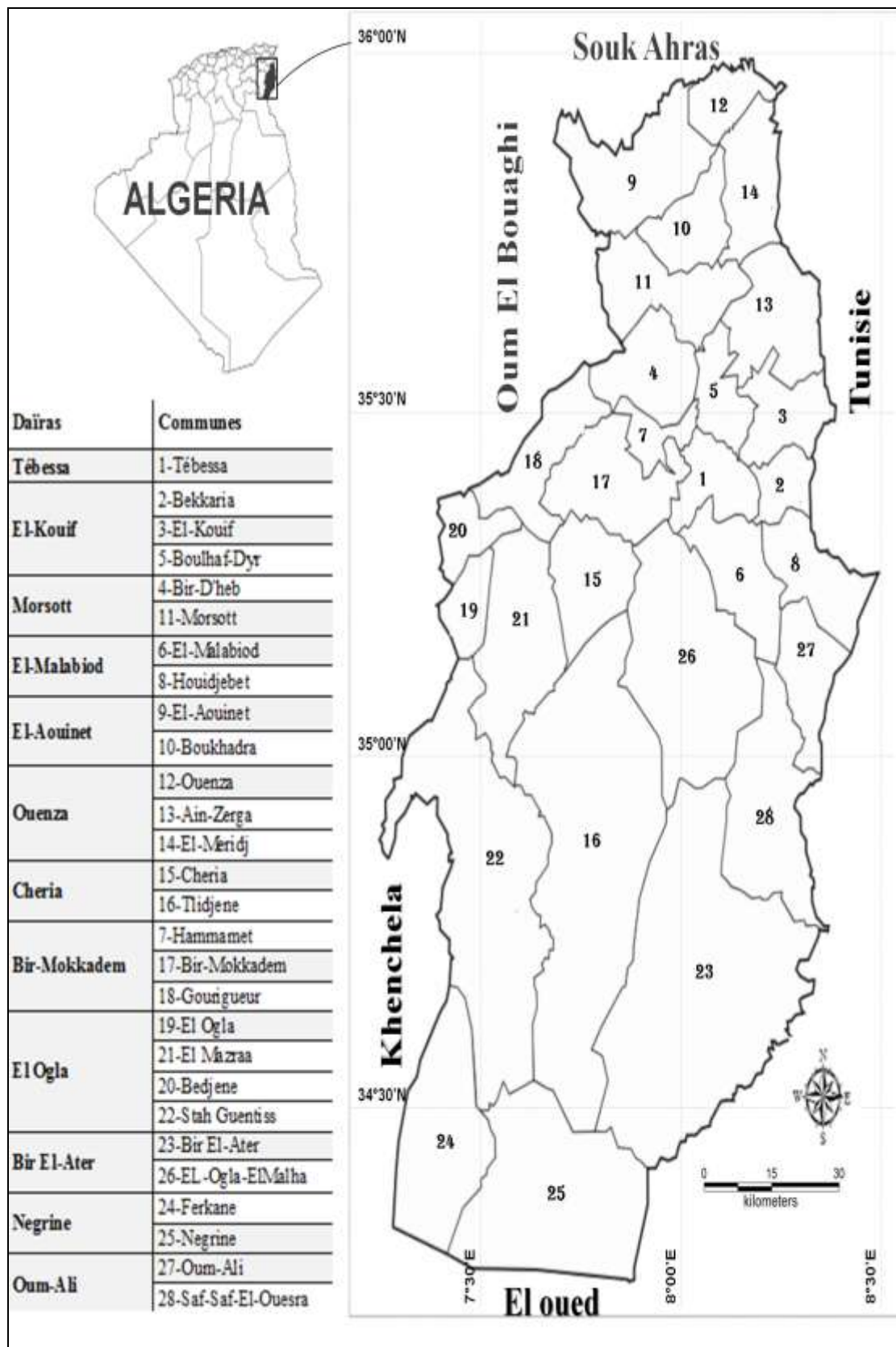


Figure 2: Localisation géographique et organisation administrative de la wilaya de Tébessa

## *Partie expérimentale*

### **1.2. Échantillonnage et prélèvements sanguins**

#### **1.1.1. Période d'étude**

La période de prise des échantillons s'étale entre le mois de Septembre 2016 et Octobre 2018, Les prélèvements ont été effectués pendant trois saisons de pic d'agnelage.

#### **1.1.2. La taille d'échantillon**

La taille minimale d'échantillon a été calculée par l'utilisation de la formule suivante (57) :  $n = \frac{1.96^2 P_{exp}(1-P_{exp})}{d^2}$  ; d'où  $P_{exp}$  (expected prevalence) : la prévalence attendue et  $d^2$  (desired absolute precision) : la précision requise ou la marge d'erreur. La taille d'échantillon requise calculée est 86 animales ; en utilisant une précision adéquate 0.05 et une prévalence attendue de 5.68% (30).

#### **1.1.3. Animaux**

Cette étude inclus 376 prélèvements provenant de 39 élevages privés d'espèce ovine, issus de 22 communes de la wilaya de Tébessa (Figure 13). Un échantillonnage aléatoire simple a été adopté au niveau de chaque troupeau pour sélectionner entre 3 à 27 animales ; soit 147 brebis ont été avortées en dernière gestation, 222 brebis allaitantes ou gestantes et neuf béliers.

#### **1.1.4. Prélèvements sanguins**

Des échantillons de sang de 5 ml ont été prélevés à la veine jugulaire de l'animal ; en utilisant des tubes secs de type Vacutainer à l'aide d'une aiguille jetables et un porte aiguille, ou bien à l'aide des seringues de 5cc pour d'autres échantillons.

Les sérums ont été extraits par centrifugation, ou bien après coagulation et décantation des prélèvements (Figure 3). Le sérum, obtenu a été aliquoté dans des tubes Eppendorf puis a été congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant d'être analysé. Aucun prélèvement de sang total n'a été réfrigéré ou congelé pour éviter l'hémolyse.

A chaque prise de sang, le tube était ensuite numéroté, et le numéro reporté sur une fiche de prélèvement où étaient indiqués la description de l'animal (date de prélèvement, sexe, présence ou absence d'avortement pendant la dernière gestation, présence ou absence des chèvres dans le même élevage, nombre de parité, taille de troupeau et taux des avortement), ces informations sont enregistrées après avoir fait un questionnaire avec les éleveurs de cheptels.

## *Partie expérimentale*

### **1.3. Test sérologique**

Tous les sérums obtenus ont été testé via un test de Rose Bengale (Rose Bengal Antigen for RAS test (Diagnostic sérologique de la Brucellose par l'Epreuve



**Figure 3: Coagulation de sang et décantation de sérum**

de l'Antigène Tamponné(EAT) ou Rose Bengale – ID.vet Innovative Diagnostics) ; la lecture a été faite au niveau du laboratoire d'hygiène–Tébessa, pendant le mois de Mai 2019.

#### **1.3.1. Description et principe**

L'épreuve à l'antigène tamponné ou Test de Plaque de Rose Bengale (RBTP/EAT) repose sur une réaction antigène-anticorps conduisant à une agglutination. Il permet la mise en évidence d'anticorps spécifique de *Brucella abortus* (bovins), *Brucella melitensis* (petits ruminants).

- C'est une méthode facile à mettre en œuvre et pouvant être appliquée à un grand nombre de sérums.

- La culture lisse de *Brucella* spp. colorée avec le colorant Rose Bengale est mélangée dans une suspension acide tamponnée et mélangée à un volume égal (gouttes) de sérum.

- Elle est basée sur une méthode d'agglutination sur lame en milieu acide (ph  $3,65 \pm 0,05$ ) qui permet de réduire l'apparition d'agglutination non spécifique.

- La coloration au Rose Bengale offre une meilleure lisibilité des agglutinats.

- Ce réactif est titré suivant la directive CE 64/432 de façon à donner un résultat positif avec sérum étalon OIEISS dilué au 1/45 et un résultat négatif avec une dilution au 1/55.

## Partie expérimentale

### 1.3.2. Réactif

Un flacon de 10 ml d'une suspension de *Brucella abortus* biovar 1 (souche 99 de weybridge) inactivée à la chaleur et au phénol, colorée au Rose Bengale et diluée en tampon acide (**Figure 4**).



**Figure 4: Réactif de Rose Bengale (photo personnelle)**

### 1.3.3. Matériel nécessaire

- Contrôle positif et négatif.
- Micropipettes délivrant 30  $\mu$ l.
- Support de réaction : lames de verre, microplaque, carton ou Bristol.
- Agitateur à usage unique : bois, verre ou plastique.

### 1.3.4. Mode opératoire : (cf. Norme NF U 47-003)

1. 25 à 30  $\mu$ l de sérum à tester et un volume équivalents de Rose Bengale sont mélangés rapidement sur une lame pour produire une zone d'un diamètre de 15 mm environ.

2. Après 4 min sous agitation lente, la présence d'anticorps spécifiques est révélée par la formation d'agglutinats visibles à l'œil nu. En absence d'anticorps spécifiques, le mélange garde un aspect homogène.

### 1.3.5. Précautions

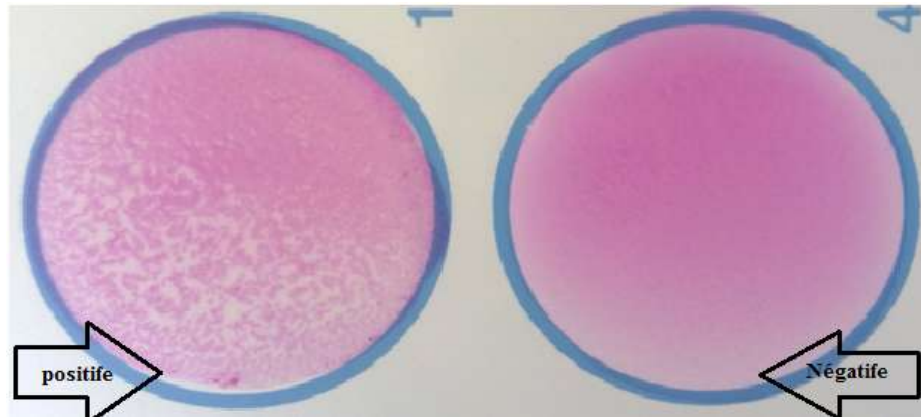
1. Tous les réactifs et les échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Les tests doivent être effectués à température ambiante ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).

2. Il est important de bien agiter le flacon d'antigène coloré (par retournement du flacon) avant son utilisation afin de garantir l'homogénéisation de la suspension.

## Partie expérimentale

### 1.3.6. Interprétation des résultats

La Rose de Bengale est une technique d'agglutination sur lame visant à la détection qualitative d'anticorps anti-*Brucella* spp. L'interprétation est faite indépendamment du type d'échantillon, l'échantillon testé est considéré positif si la suspension bactérienne est colorée et agglutinée (**Figure 5**).



**Figure 5: Sérum positif et sérum négatif (photo personnelle)**

### 1.4. Récolte et analyse des données

Après avoir analysé les échantillons sérologiques, nous avons procédé au (i) calcul des taux de séroprévalence instantanée individuelles de présence des anticorps anti-*Brucella* spp. et le taux de troupeaux séropositifs ; (ii) et de calculer le coefficient Kappa pour évaluer l'accordance entre nos résultats et celle de test ELISA.

#### 1.4.1. Calculs des taux de séroprévalence et des intervalles de confiance

Les calculs des taux de séroprévalence individuelle sont effectués en utilisant la formule suivante :

$$\text{Prévalence apparente} = \frac{\text{Nombre d'animaux positifs}}{\text{Nombre d'animaux testés}}$$

Le taux de troupeaux infectés est le rapport entre le nombre des troupeaux présentés au moins un seul cas séropositif sur le nombre des troupeaux étudiés. Les taux de séroprévalence calculées n'est que l'expression de la séroprévalence sous forme de pourcentage.

Les intervalles de confiance à 95% des pourcentages ont été établis à partir de la

formule suivante (57):  $IC = pA \pm 1.96 \sqrt{\frac{pA \times qA}{n}}$  ; D'où :

- $pA$  : la prévalence apparente.
- $qA = (1 - pA)$

## Partie expérimentale

- $n$  : la taille de l'échantillon

### 1.4.2. Test Kappa

Pour donner l'agrément à un test, comme il n'y a souvent pas de gold standard dans les tests diagnostics, il est possible de prouver l'agrément entre deux tests, l'un étant la référence.

Le Test Kappa nous permet ici de mesurer l'agrément entre les tests Rose Bengale et l'ELISA (gold standard) au-delà de ce qui peut être attendu par la chance. Nous avons donc calculé le coefficient de Kappa, qui chiffre l'intensité de l'accord réel entre des jugements qualitatifs appariés. Ce coefficient a un rang de 0 à 1, avec un agrément considéré comme modéré pour des valeurs autour de 0,4–0,5 et bon pour des valeurs supérieures à 0,5. Il se calcule avec la formule suivante (57) :

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} ; \text{ d'où :}$$

- $P_o$ : la proportion d'accord observée entre les deux tests.
- $P_e$ : la proportion d'accord aléatoire, ou concordance attendue sous l'hypothèse d'indépendance des jugements.

## 2. Résultats

### 2.1. Prévalence individuelle apparente

L'analyse des 376 sérums par la technique de Rose Bengale (EAT) a révélé 165 sérums positifs à la présence des anticorps anti-*Brucella* spp., soit un taux de séroprévalence individuelle de 43.88% (IC 95% 38.95%–48.94%) (**Figure 6**).

### 2.2. Taux de troupeau infecté

Les analyses sérologiques effectuées au niveau de 39 troupeaux, nous a permis de détecter 38 troupeaux ont été présentés au moins un cas séropositif ; soit un taux de séropositivité de 97.44% (IC95% 86.82%–99.55%)—(**Figure 6**). La distribution géographique et les taux de séropositivité au niveau de chaque troupeau ont été présentés dans la **Figure 13**.



Figure 6: Taux de séroprévalence individuelle (A) et taux de troupeau infecté (B)

### 2.3. Les facteurs de risque associés à la présence des Anticorps anti-*Brucella* spp.

#### 2.3.1. Facteur d'avortement

Parmi les 367 femelles échantillonnées dans la région d'étude, 147 femelles ont été déclarés avoir subi un avortement à la dernière gestation ; dont 59 se sont révélées positives soit un taux de séropositivité de 40.14%. Pour les 220 femelles sans antécédents d'avortement à la dernière gestation, 100 se sont révélées positives soit un taux de séropositivité de 45.45% (Figure 7).

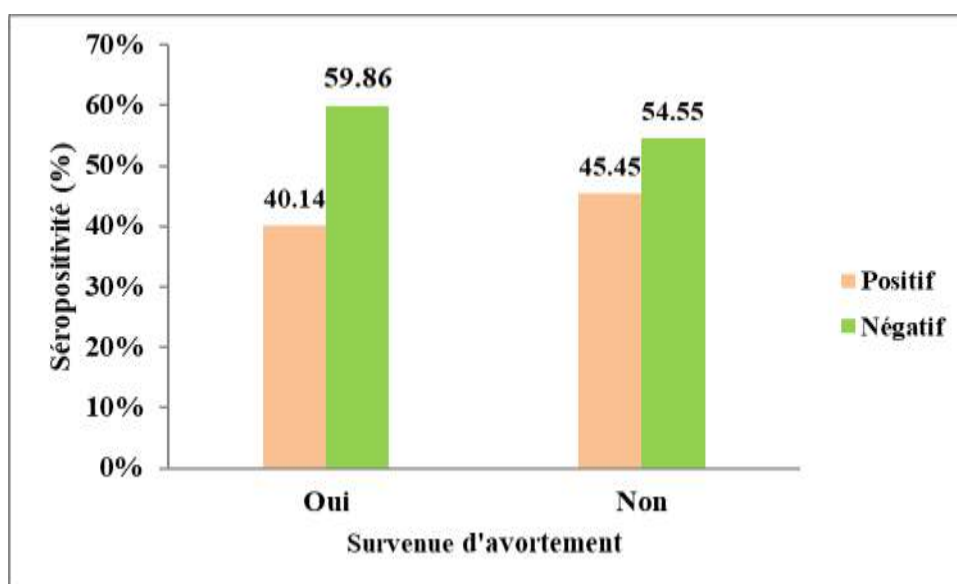


Figure 7: Distribution de taux de séropositivité en fonction de survenue d'avortement en dernière gestation

#### 2.3.2. Facteur de catégorie de parité

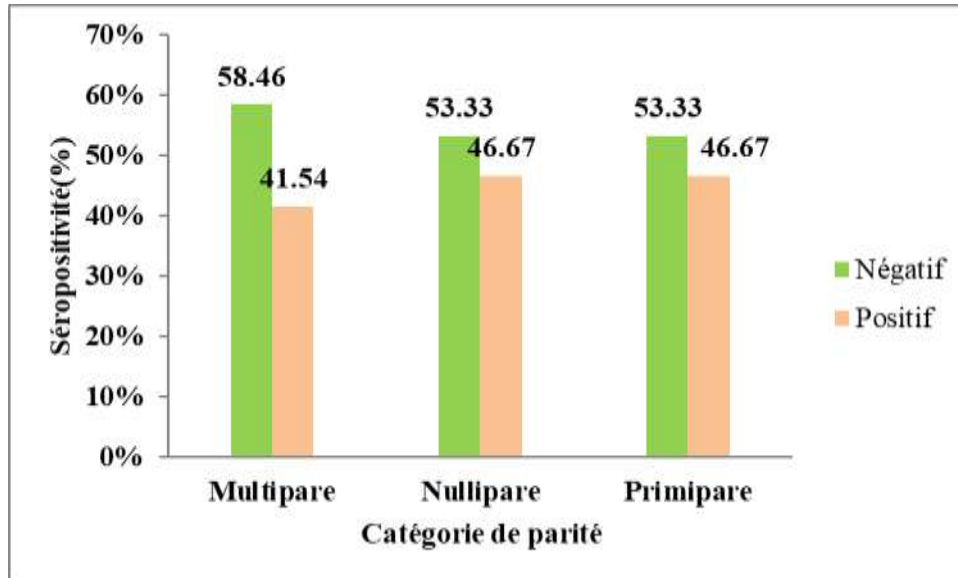
Les animaux échantillonnés sont classés en trois classes en fonction de nombre de parité (multipare, primipare et nullipare), les résultats sont avérés comme suite :

- Parmi 272 animaux multipares ; 113 animales se sont révélées positives, soit un taux de séropositivité de 41.54%.



## Partie expérimentale

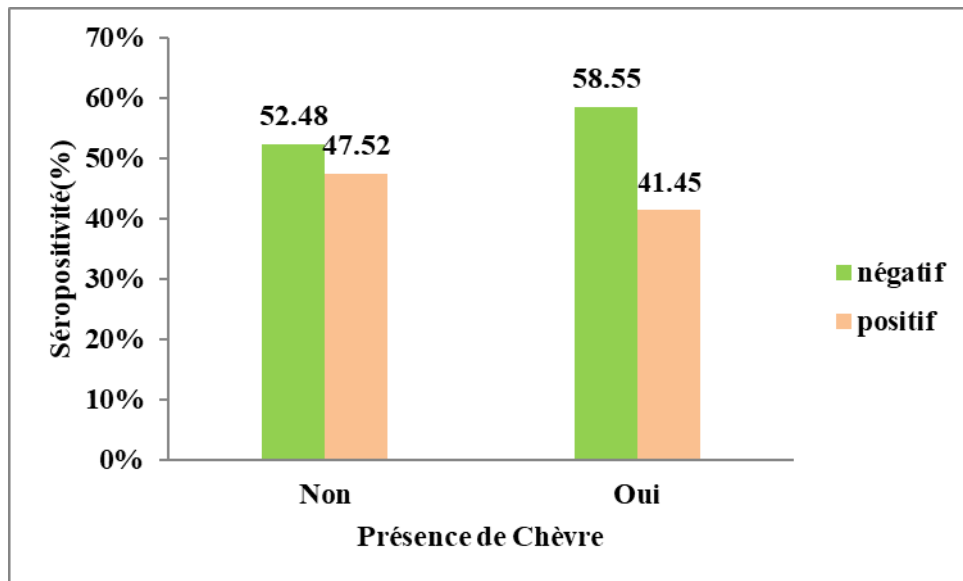
- 75 brebis primipares, entre eux 35 brebis se sont révélées positive, soit un taux de séropositivité 46.67%.
- Et, 30 brebis nullipares dont 14 se sont révélées positive avec un taux de séropositivité de 46.67 % (**Figure 8**).



**Figure 8: Distribution de taux de séropositivité en fonction de catégorie de parité.**

### 2.3.3. Présence de chèvre

Parmi 376 animales échantillonnés dans la région d'étude, 275 têtes sont en élevage commun avec des chèvres et 101 têtes n'ont pas en contact avec l'espèce caprine, les taux de séropositivités sont 41.45% (114/275) et 47.52% (48/101) respectivement (**Figure 9**).



**Figure 9: Distribution de taux de séropositivité en fonction de la présence de chèvre**

#### **2.3.4. Taille de Troupeau**

Les troupeaux étudiés, sont repartis en quatre classes en fonction de ses tailles (Taille <30 têtes/troupeau, 30-100 têtes/troupeau, 100-200 têtes/troupeau et >200 têtes/troupeau). Les résultats de séropositivité mesurés à l'échelle individuelle sont avérés comme suite (**Figure 10**) :

- Parmi 20 têtes provenant du cheptel de taille moins de 30 têtes/troupeau, sept prélèvements se sont révélés positive, soit un taux de séropositivité de 35%.
- 184 animales ont été échantillonnées dans des troupeaux de taille 30-100 têtes/troupeau ; 88 prélèvements se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 47.83%.

## Partie expérimentale

➤ Dans les troupeaux de taille comprise entre 100-200 têtes/troupeau ; nous avons échantillonnés 119 animales, 48 se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 40.34%.

➤ Et, pour la dernière classe (>200 têtes/troupeau) ; 53 animales ont été échantillonnés, dont 19 se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 35.85%.

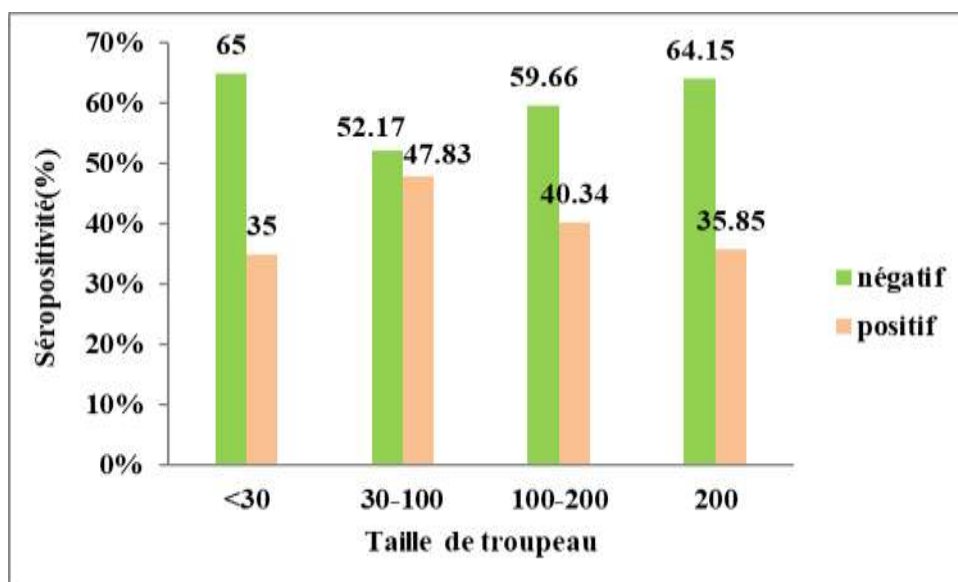


Figure 10: Distribution de taux de séropositivité en fonction de taille de troupeau

### 2.3.5. Facteur de sexe

Les 376 animales étudiés sont répartis en fonction de sexe comme suite, 9 béliers dont 3 se sont révélés positif (33.33% taux de séropositivité) et 367 brebis dont 159 se sont révélés positive (43.32% taux de séropositivité) (Figure 11).

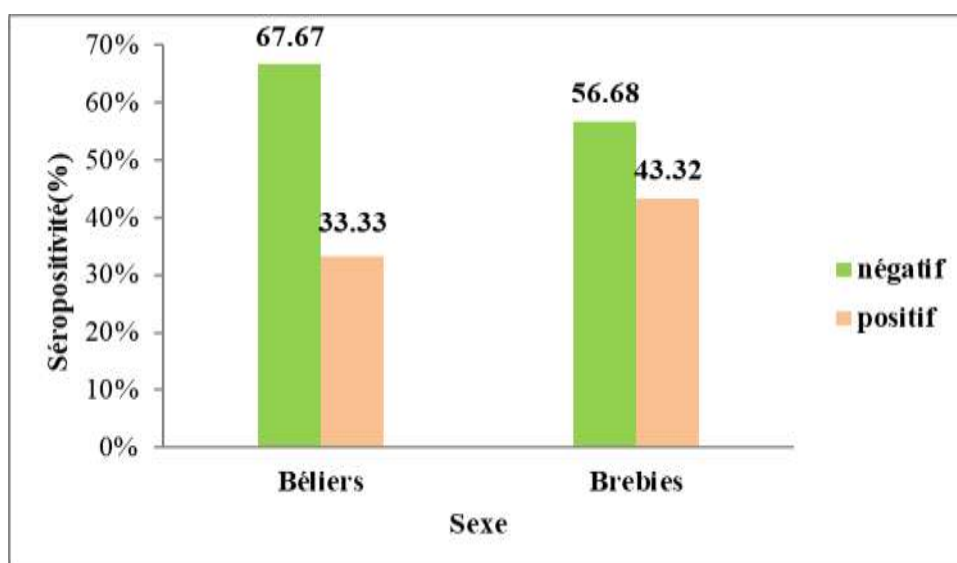


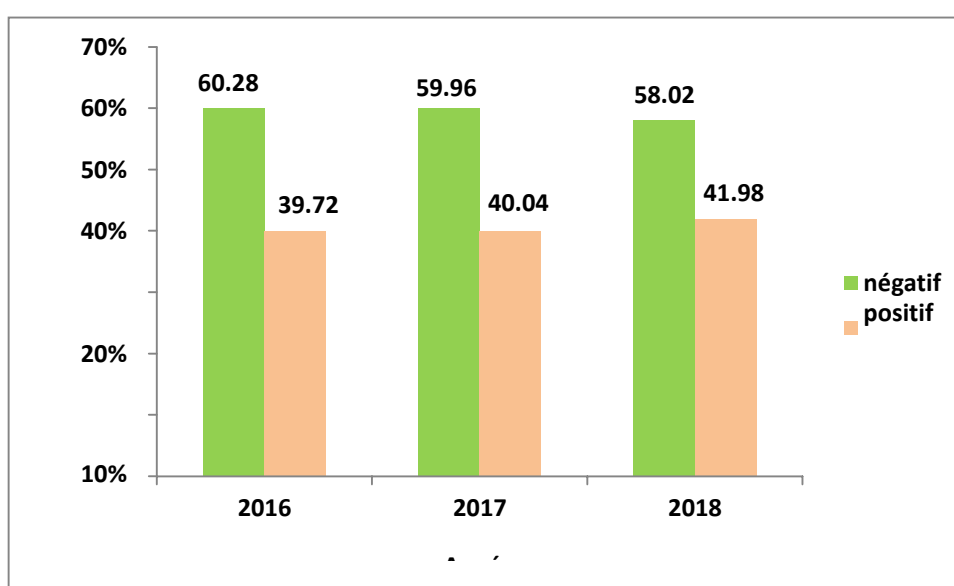
Figure 11: Distribution de taux de séropositivité en fonction de sexe

## Partie expérimentale

### 2.3.6. Facteur année (2016 /2017/ 2018)

Parmi les 376 animales échantillonnées dans la région d'étude tout au long de la période d'étude, les résultats se sont avérés comme suit (**Figure 12**) :

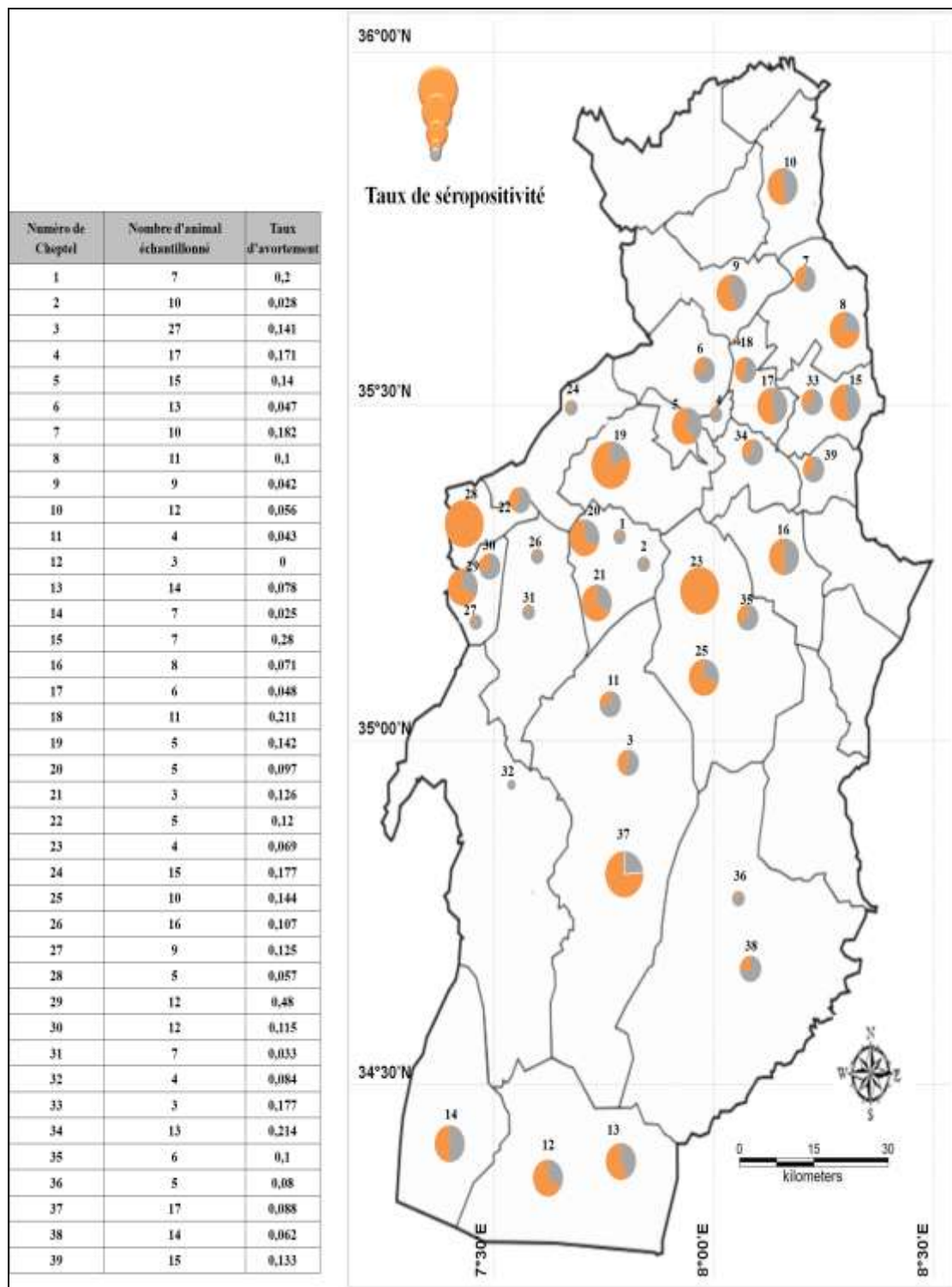
- En 2016, 141 animales ont été échantillonnées, 56 se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 39.72%.
- En 2017, Parmi les 104 animales échantillonnées, 51 se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 40.04%.
- Et, 131 animales échantillonnées et testés en 2018, 55 se sont révélés positive soit un taux de séropositivité de 41.98%.



**Figure 12: Distribution de taux de séropositivité en fonction d'année**

### 2.3.7. Facteur taux d'avortement

Le taux d'avortement est le rapport entre le nombre de brebis ayant été avortée sur le nombre total des brebis présentes dans le troupeau, il est entre 0% et 48% avec un taux moyen de 11.77% (**Figure 13**).



**Figure 13 : Distribution géographique et taux de séropositivité au niveau de chaque troupeau.**

La couleur et la taille de cercle sont proportionnelles aux taux de séropositivité

#### 2.4. L'analyse statistique (Test de *Khi-deux*)

Le test de khi-deux a montré qu'aucune de sept variables testées a une association significative ( $p > 0.05$  pour toutes les variables) (Tableau 2).

**Table 2: Analyse statistique des facteurs de risque (Test de *khi-deux*)**

Variable	Catégories	Nombre de cas testés	Cas positif (%)	$X^2$	$p$
1. Avortement en dernière gestation	Oui	147	59 (40.14)	1.015	0.314
	Non	220	100 (45.45)		
2. Catégorie de parité	Nullipare	30	14 (46.67)	0.762	0.683
	Primipare	75	35 (46.67)		
	Multipare	272	113 (47.52)		
3. Présence de chèvre	Oui	275	114 (41.45)	1.11	0.292
	Non	101	48 (47.52)		
4. Taille de troupeau	< 30	20	7 (35)	3.718	0.294
	30-100	184	88 (47.83)		
	100-200	119	48 (40.43)		
	>200	53	19 (35.85)		
5. Sexe	Béliers	9	3 (33.33)	0.358	0.55
	Brebis	367	159 (43.32)		
6. Année	2016	141	56 (39.72)	2.22	0.329
	2017	104	51 (40.04)		
	2018	131	55 (41.98)		
7. Taux d'avortement	C'est une variable quantitative continue $p=0.758$ et $OR=0.950$				

### 2.5. Comparaison de résultats (coefficient Kappa)

Les épreuves à l'antigène tamponné étant réalisées et comparées avec celles obtenue par le test ELISA. L'accordance observée entre les deux tests a été trouvée dans 16 cas positif et 199 cas négatifs ; les résultats de 161 sérums ont été différents entre les deux tests (**Tableau 3**). La mesure d'accord entre les deux tests par le coefficient Kappa ( $k=0.015$ ) calculé à l'aide de logiciel SPSS 22 ; a montré que le test de Rose Bengale moins performant que le test ELISA considéré comme gold Standard.

**Table 3: Tableau contingence pour les résultats de deux tests**

		Test ELISA		
		Positif	Négatif	Total
Test EAT	Positif	16	146	162
	Négatif	15	199	214
	Total	31	345	376

### **3. Discussion:**

Dans cette étude, le taux de séroprévalence des anticorps anti-*Brucella* spp. détectés par le test EAT (43.88%) est plus élevé à celle reporté sur les mêmes échantillons via le test ELISA (8.24%). Les résultats de deux tests sont supérieurs aux résultats trouvés par **Gabli** et al., 2015 (17), dans les wilayet de Sétif et Batena, **Aggad** et al., 2003 (4) dans la région de Tiaret et par **Nehari** et al, 2014 (41) dans la région d'el bayadh d'où les taux de séroprévalence sont 0.98%, 2.6% et 3% respectivement.

Le taux de troupeau séropositif est aussi très élevé (97.44%), il est supérieur à celui trouvée par l'utilisation de test ELISA sur les mêmes échantillons d'où 10 troupeaux ont au moins un cas séropositif (taux de séropositivité de 25.64%). Les deux résultats sont supérieurs aux études précédentes réalisées en Algérie, à celle mené par le ministère de l'agriculture et de développement rurale (MADR) en 2014 d'où les taux de troupeaux infectés sont 5.68% et 10% mesuré à l'échelle nationale et dans la région de steppes respectivement (30), il est aussi supérieur à celui trouvé par **Gabli** et al., 2015 (17) avec 15.84% de troupeau infecté.

La différence dans les taux de séroprévalence rapporté dans différentes études peut être expliquée en grande partie par le test de dépistage utilisé. Le test EAT peut donner des résultats incorrects à cause des réactions croisées avec des bactéries du même genre (39), et ne peut pas distinguer les cas vaccinés des cas infectés (62), sachant que la wilaya de Tébessa est l'une de 32 wilaya concernés par les campagnes de vaccination depuis 2006, chose qui confirme la difficulté de distinguer les anticorps vaccinaux à celui résultent après des infections par des souches sauvages (pathogène ou pas). De plus, les différentes investigations menées sur l'occurrence de maladie ont montré que la prévalence de la brucellose animale tant au niveau individuel qu'au niveau des troupeaux varie en fonction de (i) région d'étude d'où les systèmes d'élevage, les conditions écologiques sont différents ; (ii) le type d'étude menée (53) (11).

Le résultat du test kappa ( $k=0.015$ ) montre l'existence d'une concordance médiocre ( $<0.4$ ) entre les tests de Rose Bengale et ELISA (Gold standard), cette mauvaise agrément entre les deux tests peut expliquer par le nombre très élevé des résultats "faux positif" (146 cas) par apport les résultats "faux négatif" (15 cas),

### *Partie expérimentale*

trouvés par le test de Rose Bengale ; ceci peut induire comme nous l'avons expliqué plus haut par la présence des anticorps vaccinaux qui augmente en grande partie le nombre de cas "faux positif", par ce que nous avons respectés rigoureusement l'application de méthode EAT pour éviter les résultats erronés (agitation pendant 4 minutes puis la lecture ; une agitation pendant une période moins que 4 minutes va donner des faux négatifs et plus de 4 minutes va donner des résultats faux positif à cause des réactions croisées).

De plus, le test kappa ne tient pas compte de la proportion des positifs au Rose Bengale qui ont été confirmés par test ELISA "Vrai positif" (16 cas) : il ne prend pas en compte la sensibilité et la spécificité de chaque test. Ceci confirme que même si l'accord entre deux tests est assez faible, n'exclut pas la présence des anticorps dues à une infection.



### **Conclusion**

La brucellose est une anthroponose professionnelle à déclaration obligatoire, due à une bactérie du genre *Brucella* spp. Etant conscients de risque que représente la brucellose sur le plan Socio-économique et ces répercussions négatives par des pertes économiques insupportables surtout dans les pays en voie de développement.

Dans cette étude, la séroprévalence des anticorps anti- *Brucella* spp. est très élevée par rapport au résultat de test ELISA réalisé sur les mêmes échantillons, ainsi aux autres études réalisées en Algérie, La discordance entre les résultats de deux test (coefficient Kappa =0.015) et l'absence d'association statistique entre la séropositivité et tous les facteurs de risque étudiés confirment que beaucoup de cas positifs sont réellement des cas faux positifs, qui peuvent être expliqués par la présence des anticorps vaccinaux.

La meilleure mesure de lutte contre la brucellose animale nécessite des mesures prophylactiques sanitaires et médicales ; consistent sur le dépistage des cas positifs avec une confirmation en cas de résultats positifs, à l'aide des tests plus spécifiques comme l'ELISA ; l'abattage systématique des animaux séropositifs et la vaccination des cas négatifs sont indispensables pour éradiquer et protéger notre cheptel.

Pour lutter contre la brucellose humaine les mesures d'hygiène notamment pour les professionnels (éleveurs, médecins vétérinaires, laborantins...) avec l'éviction de la consommation des produits laitiers non pasteurisés sont primordiales.

Enfin, pour l'éradication de cette zoonose il faut insister sur l'étroite collaboration entre tous les parties concernées.

## Références bibliographiques

- (1) **ACHA, Pedro N., SZYFRES, Boris.** (2003). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, third ed., vol. 1.* Washington, DC.: Pan American Health Organization (PAHO).
- (2) **ACHA, Pedro N., SZYFRES, Boris.** ( 2005). *Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Volume I : bactérioses et mycoses. 3ème édition.* Paris: Office international des épizooties.
- (3) **Adone, R. e.** (2013). *Epidemiosurveillance of brucellosis* (Vol. 32). Revue scientifique et technique de l'OIE.
- (4) **Yasser N. Haggag., Hamed A. Samaha., Mohamed A. Nossair., Hend S. Mohammad.** (2003). Serological studies of animal brucellosis in Algeria. *Assiut veterinary medical journal*, 49, 121–130.
- (5) **Akakpo, A. J., Têko-Agbo, A., Koné, P.** (2009). *L'impact de la brucellose sur l'économie et la santé publique en Afrique.* Afrique: In : Conf. OIE.Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires.
- (6) **Bang, Bernhard.** (1897). The etiology of epizootic abortion. . *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics.* 10 , 125-149.
- (7) **Boraker, D. K., Stinebring, W. R., Kunkel, J. R.** (1981, octobre). Boraker, D., StineBrucELISA : an Enzyme-Antibody Immunoassay for Dectection of Brucella abortus Antibodies in Milk : Correlation with the Brucella Ring Test and with Shedding of Viable Organisms. *Journal of clinical microbiology*, 14(4), 396-403.
- (8) **BRICKER, Betsy. J.** (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary microbiology*, 90, 435-446.
- (9) **BRUCE, Sir David.** (1887). *Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever* (Vol. 39). Practitioner.
- (10) **Silva, T., Costa, E. A., Paixão, T. A., Tsolis, R. M., Santos, R. L.** (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary journal*, 184(2)pp. 146-155.

## *Partie expérimentale*

- (11) **Chimana, H. M., Muma, J. B., Samui, K. L., Hangombe, B. M., Munyeme, M., Matope, G., Tryland, M.** (2010). A comparative study of the seroprevalence of brucellosis in commercial and small-scale mixed dairy–beef cattle enterprises of Lusaka province and chibombo district zambia. *Tropical Animal Health and Production* , 42(7), 1541-1545.
- (12) **Collin, E. e.-1.** (2007). Les brucelloses, zoonoses. *bulletin des GTV* , pp. 107-109.
- (13) **CORBEL, Michael J.** (2006). *Brucellosis in Humans and Animals*. World Health Organization.
- (14) **Diaz Aparicio, E.** (2013). *Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by Brucella melitensis, Brucella suis and Brucella abortus* (Vol. 32). Revue Scientifique et technique de l'OIE.
- (15) **EVANS, Alice C.** (1918). Further Studies on Bacterium Abortus and Related Bacteria III. Bacterium Abortus and Related Bacteria in Cow's Milk. *Journal of Infectious Diseases*. 23, 354-372.
- (16) **FENSTERBANK, R.** (1986). *Brucellose des bovines et des petits ruminants: diagnostic, prophylaxie et vaccination* (Vol. vol. 5). Revue scientifique et technique de Office international des épizooties(OIE).
- (17) **Gabli, A., Agabou, A., Gabli, Z.** (2015). *Brucellosis in nomadic pastoralists and their goats in two provinces of the eastern Algerian high plateaus*. *Tropical animal health and production* , 47(6), 1043-1048.
- (18) **Gagnière J, P.** (2010). La brucellose animale. *Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises*, 49 . Lyon.
- (19) **Garin Bastuji, B.** (1993). Brucellose bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention. *Le point vétérinaire*, 25(152), 15-22.
- (20) **Garin Bastuji, B.** (1993). Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés, le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Le point vétérinaire*, 25(152), 23-32.
- (21) **Garin Bastuji, Bruno.** (2003). La brucellose Ovine et caprine. *Le point vétérinaire*, 235, 22-26.
- (22) **Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., Marin, C., Albert, D.** ( 2006). *The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools*, Vol. 62, pp. 63-70. Small ruminant research.
- (23) **Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., Grayon, M., Verger, J. M.** (1998 ). *Brucella melitensis infection in sheep . present and future*. *Veterynary Research*, pp. 255-274.

## *Partie expérimentale*

- (24) **Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M.** (2016). *Pathogens in Milk–Brucella spp.*
- (25) **Godfroid, J., Garin-Bastuji, B., Saegerman, C., Blasco, J. M.** (2013). *Brucellosis in terrestrial wildlife* (Vol. 32). Revue scientifique et technique de l'OIE.
- (26) **Haddad, N.** (2010). *Les zoonoses infectieuses, Polycopié des Unités de maladies contagieuses*. 189 p. Lyon: Ecoles vétérinaires françaises.
- (27) **Hars, J., Garin-Bastuji, B.** (2013). La brucellose dans la faune sauvage française. *Le point vétérinaire* 332, pp. 52-53.
- (28) **Hars, J., Rautureau, S., Jaÿ, M., Game, Y., Gauthier, D., Herbaux, J. P., Mick, V.** (2013). Réseau SAGIR ; Hars, J Un foyer inattendu de brucellose à *Brucella melitensis* chez les ongulés sauvages du massif du Bargy en Haute-Savoie (Vol. 176). Lettre SAGIR.
- (29) **HEBANO, H. A.** (2013, Juillet 20). ETUDE SERO-EPIDEMIOLOGIQUE DE LA BRUCELLOSE. la faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar, DAKAR, 38-39-42.
- (30) **Kardjadj, M.** (2016). The epidemiology of human and animal brucellosis in Algeria. . *Journal of Bacteriology and Mycology*, 3(2), 1025.
- (31) **Laudat, P., Audurier, A., Choutet, P., De Gialluly, C., Ducroix, J. P., Loulergue, J.** (1987). Sérologie de la brucellose : évaluation comparative des réactions d'agglutination, de fixation du complément, d'immuno-fluorescence indirecte et de la contre-immuno-électrophorèse. *Médecine et maladies infectieuses*, 2, 58.
- (32) **Mainar-Jaime, R. C., Muñoz, P. M., de Miguel, M. J., Grilló, M. J., Marín, C. M., Moriyón, I., Blasco, J. M.** (2005). Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in Brucella-free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Canadian Veterinary Journal*,
- (33) *Maladies, infections et infestations de la Liste de l'OIE.* (2019). Récupéré sur <http://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/maladies-de-la-liste-de-loie-2019/>: <http://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/maladies-de-la-liste-de-loie-2019/> 46, 913-916.
- (34) **Marston, J.** (1863). Report on Fever (Malta). *Army Medical Department Report*, 3, 520-521.
- (35) **Martirosyan, A., Moreno, E., Gorvel, J. P.** (2011). *An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen* (Vol. 240). Immunological reviews.

## *Partie expérimentale*

- (36) **Maurin, M.** ( 2005). *La brucellose à l'aube du 21ème siècle*. Médecine et maladies infectieuses. Vol. 35, pp. 6-16.
- (37) **Memish, Z. A., Balkhy, H. H.** (2004). Brucellosis and international travel. *Journal of travel medicine*, 11(1), 49-55.
- (38) **Munoz, P. M., Marin, C. M., Monreal, D., Gonzalez, D., Garin-Bastuji, B., Diaz, R., Blasco, J. M.** (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of False-Positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.*, pp. 141-151.
- (39) **Munoz, P. M., Marin, C. M., Monreal, D., Gonzalez, D., Garin-Bastuji, B., Diaz, R., Blasco, J. M.** (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *yesinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(1), 141-151.
- (40) **Musallam, I. I., Abo-Shehada, M. N., Hegazy, Y. M., Holt, H. R., Guitian, F. J.** (2016). "Systematic review of brucellosis in the Middle East: disease frequency in ruminants and humans and risk factors for human infection," *Epidemiology and Infection*, vol. 144, no.4.
- (41) **Nehari, H., Aggad, H., Derrer, S., Kihal, M.** (2014). *Séroprévalence de la brucellose caprine et humaine dans la région d'El-Bayadh* (Vol. 8). Review of industrial microbiology sanitary and environmental.
- (42) **NIELSEN, Klaus.** (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary microbiology*, 90, 447-459.
- (43) **Olsen, S. C.** ( 2013). *Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination* (Vol. 32 ). *Revue scientifique et technique de l'OIE*.
- (44) **Olsen, S., Tatum, F.** (2010). *Bovine brucellosis*. *Vet Clin Food Anim*. Vol. 26, pp. 15-27.
- (45) **ALAMBEIDJI, M. R. B., & KANE, M. Y.**OMS. ( 2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.-13ème édition,345p. Paris: OIE.-345p.
- (46) **Poester, F. P., Samartino, L. E., Santos, R. L.** (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock . *Revue scientifique et technique de l'OIE.*, (Vol. 32) pp. 105-115.
- (47) **RAHAL K., D. A.** (2009). Brucellose des petits ruminants. *Stratégie de lutte, dans le contexte algérien. Recueil des Ateliers d'épidémiologie animale, Vol 1*, 20-24p.

## *Partie expérimentale*

- (48) **Reyes, R. E., González, C. R., Jiménez, R. C., Herrera, M. O., Andrade, A. A., Karunaratne, D. N.** (2012). *The complex World of Polysaccharides, Chapter 3 : Mechanisms of O-Antigen Structural Variation of Bacterial Lipopolysaccharide(LPS)*. . Desiree Nedra Karunaratne. pp. 71-98.
- (49) **RICHEY, Eddie Joe, HARRELL, C. Dix.** (1997). Brucella Abortus Disease (Brucellosis) in Beef Cattle. *University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS, vm100*, 1-6p.
- (50) **Roop, R. M., Bellaire, B. H., Valderas, M. W., Cardelli, J. A.** (2009). Survival of the fittest : how Brucella strains adapt to their intracellular niche in the host. *Medical microbiology and immunology*, 198, 221-238.
- (51) **Samartino, L. e.** (1993). *Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis* (Vol. 16). Comparative immunology, microbiology and infectious diseases.
- (52) **Sanogo, M., Cissé, B., Ouattara, M., Walravens, K., Praet, N., Berkvens, D., Thys, E.** (2008). *Prévalence réelle de la brucellose bovine dans le centre de la Côte d'Ivoire* (Vol. 61). Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.
- (53) **Scholz, H. C., Vergnaud, G.** ( 2013). *Molecular characterisation of Brucella species*. . Revue scientifique et technique de l'OIE. Vol. 32, pp. 149-162.
- (54) **Seleem, M. B. Seleem, M.N., Boyle, S.M.**(2010) Brucellosis : A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology*, 140, 392-398.
- (55) **Skendros, P. e.** (2013). Immunity to brucellosis. *Revue scientifique et technique de OIE*, 32, 137-147.
- (56) **Thrusfield, M., Christley, R.** (2018). *Veterinary epidemiology*. (éd. 3rd ed). (J. W. Sons., Éd.) Blackwell Publishing, Oxford.
- (57) **Valette, L.** (1987). *"Prophylaxie médicale de la brucellose animale* (Vol. 40). dans pays tropicaux: " Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.
- (58) **Vanzini, V. R., Aguirre, N. P., Valentini, B. S., de Echaide, S. T., Lugaresi, C. I., Marchesino, M. D., Nielsen, K.** (2001). Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to Brucella abortus in bulk milk samples. *Veterinary microbiology*, 82(1), 55-60., 82(1), 55-60.
- (59) **Wyatt H, V.** (2013). *Lessons from the history of brucellosis* (Vol. 32). Revue scientifique et technique de l'OIE.
- (60) **Zammit, T.** (1905). *A preliminary note on the examination of the blood of goats suffering from Mediterranean fever*. London: Reports of the Royal Society of

***Partie expérimentale***

London, Mediterranean fever commission, London, Harrison and Sons, part 3, 83.

(61) **Zundel, E., Verger, J. M., Grayon, M., Michel, R.** (1992). Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses. *Annals of Veterinary Research*, 23(2), 177-188.

(62) *Chapitre 2.3.1: Bovine Brucellosis In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial animals* (éd. 13<sup>ème</sup> édition). (2004). Paris, France: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE)