

République Algérienne Démocratique et

Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et la
Recherche Scientifique

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية
الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences

En Sciences VétérinairesThème :

Génotypage de *Coxiella burnetii*, *Chlamydia spp* et *Leptospira spp* détectées dans des tissus placentaires chez des vaches laitières ayant avorté dans le nord de l'Algérie.

Présentée par : Dr. RAHAL. Mohamed

Les membres du jury :

Lamara Ali	MCA ensv	Président
Boukhors Karima T	Professeur ensv	Examinatrice
Alloune Fatma	Prof Faculté de médecine Blida 1	Examinatrice
Hamrioui B	Professeur CHU.M. Bacha	Examineur
Arab Karim	Professeur Faculté des sciences université de Bumerdès	Examineur
BITAM Idir	Professeur ESSAIA Alger	Directeur de thèse

Année universitaire : 2018/2019.

Remerciements

Ala fin de ce travail réalisé en collaboration entre le laboratoire Aix-Marseille Univ, IRD, SSA, AP-HM, VITROME, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France. et l'école nationale supérieure vétérinaire d'Alger, j'aimerais réserver ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance pour tous ceux qui ont apporté une contribution scientifique, logistique ou morale à ce modeste travail.,

Je voudrais tout d'abord remercier grandement,

*Professeur **BITAM Idir** (Biologiste-Entomologiste médical, PhD-Habilitation à Diriger les Recherches à la Faculté de Médecine, Aix Marseille Université, Habilitation Universitaire Enseignant-Chercheur*

Ecole Supérieure en Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaire d'Alger) pour son aide précieuse pour ma recherche scientifique. il a toujours fait tout son possible pour m'aider.

*Il m'est impossible d'oublier Professeur **PAROLA Philippe** (Director of VITROME Vectors – Tropical and Mediterranean Infections Research Unit Marseille – Dakar – Papeete- Algiers Aix-Marseille University) , pour tous son aide, de m'avoir accueilli à bras ouverts au sein de son laboratoire de recherche. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de ce travail.*

*Je remercie également **D. Tahir, C. Eldin, et D. Raoult** qui ont su inspirer le titre de ce travail scientifique, et m'ont fait l'honneur d'être co-auteurs de mon article scientifique, ils ont pris le temps de m'écouter et de discuter avec moi. Leurs remarques m'ont permis d'envisager mon travail sous un autre angle. Pour tout cela je les remercie.*

Je tiens à remercier

Lamara Ali (MCA env), Boukhors Karima T (Prof env), Alloune F (Prof Faculté de médecine Blida 1) Hamrioui B (Pr CHU.M. Bacha) et Arab K (Prof Faculté des sciences Boumerdès) pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour leur participation scientifique ainsi que le temps qu'il a consacré à ma recherche.

*Je tiens à remercier particulièrement **D. Tahir** pour toutes nos discussions et ses conseils qui m'ont accompagné tout au long de mon cursus.*

Mes derniers remerciements vont à mes amies qui ont tout fait pour m'aider, qui m'ont soutenu et surtout supporté dans tout ce que j'ai entrepris.

DEDICACES

Merci a ma famille à laquelle je dois cette réussite professionnelle,

A mes parents

Pour avoir fait ce que je suis,
Sans votre soutien à tous niveaux, je n'y serais jamais arrivé,

A ma Mère

Pour tous les conseils avisés.....
Et pour avoir fourni la matière première

A mon père

Pour m'avoir donné cette vocation et l'amour de la science
Ta vie est un modèle
Ce travail vous est dédié, en témoignage de mon affection

**A mon frère soufiane et mes sœurs Akila, imen et Hadjer, mes adorables neveux
Ryadh et Lokmane et surtout ma petite nièce Dounya**

Pour avoir contribué à ma réussite,
Pour m'avoir soutenu et avoir cru en moi

**A tous mes amis : besbeci, Omar (3o), Rachid, Bachen, Soufian, Mohamed,
Abdellah, hacen, Ibrahim, amine, Amel, Mira Imen.....ext**

A tous ceux et toutes celles qui portent le nom RAHAL

Tables des matières

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction

Table des matières

I. Les avortements.....	1
Les principales causes d'avortements	1
Diarrhée virale bovine/maladie des muqueuses (BVD/MD)	1
II. Coxiella burnetii.....	2
II.1. taxonomie	2
II.2. Bactériologie	2
II.3. Génétique.	3
III. Diagnostic de laboratoire	3
III.1. Collecte et stockage des échantillons.....	3
III.2. Culture en milieu axénique ; CCM (Complex Coxiella Medium).....	4
III.3. Identification par biologie moléculaire	4
III.3.1. Réaction en chaîne par polymérase	4
III.3.2. Typage de Coxiella burnetii	5
environnementaux.....	5
IV. Distribution géographique	8
IV.1. En Europe	8
IV.1.1. La Russie.....	8
IV.1.2. L'Allemagne	9
IV.1.3. La France.....	10
IV.1.4. Le Royaume-Uni.....	13

Tables des matières

IV.1.5. L'Italie.....	14
IV.1.6. L'Espagne	14
IV.1.7. Les Pays-Bas	15
IV.1.9. Portugal	16
IV.1.11. Slovaquie.....	17
IV.2. Afrique	18
IV.2.1. Ethiopie	22
IV.2.2. Sénégal	22
IV.2.3. En Tunisie	23
IV.3. Amérique	23
IV.3.1. États-Unis d'Amérique	23
IV.3.2. Canada.....	25
IV.4. Asie	25
IV.4.1. Chine	25
IV.4.3. Japon	25
V. <i>Chlamydia</i> revu historique et classification taxonomique.....	26
V.1. Taxonomie	26
V.2. Importance médicale	27
V.3. Infection chez les bovins.....	28
V.4. Détection des <i>chlamydias</i>	28
V.4.1. Détection d'antigène	29
V.4.2. méthode d'amplification par PCR	30
•PCR Conventionnelle	30
•Real-time PCR.....	32
V. <i>Leptospirare</i> revu historique et classification taxonomique	34
V. 1. Bactériologie	35
Partie expérimentale	38

Tables des matières

I. Problématique.....	38
II. Objectifs de l'étude	38
II.2. Cadre de l'étude et de collecte des échantillons :.....	39
I. Matériel et méthodes	40
III.1. Prélèvement.....	40
III.1.1. <i>Coxiella burnetii</i>	40
Critères épidémiologiques.....	40
Critères cliniques.....	40
Critères lésionnels	40
III.1.2. <i>Chlamydia</i> sp (<i>Chlamydia psittaci</i> , <i>C. abortus</i> et <i>C. pecorum</i>).....	40
Critères épidémiologiques.....	40
Critères cliniques.....	41
Critères lésionnels	41
III.1.3. <i>Leptospirose</i> (<i>Leptospira hardjo</i> , <i>Leptospira pomona</i>)	41
Critères épidémiologiques.....	41
Critères cliniques.....	41
III.2. Technique de prélèvement	41
III.3. Biologie moléculaire	42
III.3.1. Extraction d'ADN	42
III.3.2. Détections par RT-PCR.....	44
III.3.2.A. <i>Coxiella burnetii</i>	44
Détection moléculaire de <i>Coxiella burnetii</i> par PCR en temps réel.....	44
•Séquençage des zones intergéniques (MST) :	46
III.3.2.B. <i>Chlamydia</i> Spp	52
Détection moléculaire de <i>Chlamydia</i> Spp par PCR en temps réel	52
•Le séquençage des résultats positifs par RT-PCR :	53
III.3.2.C. <i>Leptospira</i> sp (<i>Leptospira hardjo</i> , <i>Leptospira pomona</i>)	54

Tables des matières

IV. Résultats :	58
IV.1.1. Détection de <i>Coxiella burnetii</i> par PCR en temps réel (RT-PCR) :.....	58
IV.1.2. Détection de <i>Coxiella burnetii</i> par PCR standard :.....	61
IV.1.3. Résultats de génotypage par séquençage des zones intergéniques :	61
IV.2.1. Détection de <i>Chlamydia</i> Spp par PCR en temps réel (RT-PCR) :.....	63
IV.2.2. Résultats obtenus par séquençage des <i>Chlamydias</i> Spp	65
IV.3. Recherche des leptospires par PCR en temps réel (RT-PCR) :	65
V. Discussion :.....	66
VI. Conclusion.....	72
VII. Recommandations.....	74

Liste des figures, des tableaux et des abréviations

Liste des figures

Figure 1: Distribution mondiale des différents génotypes MST identifiés dans des échantillons humains animaux et environnementaux (Eldin et al. 2017).....	7
Figure 2: Répartition des différents génotypes de MST de <i>Coxiella Burnetii</i> en France (Sophie Edouard et al).....	13
Figure 3: Exemples d'une technique de coloration utilisée pour diagnostiquer <i>C. abortus</i> responsable de l'avortement chez les ovins(Sachse et al. 2009).	29
Figure 4: découpage des échantillons de placentas et de cotylédons sous une Hotte à flux laminaire (photo personnelle).....	42
Figure 5: A ; Cartouche de réactifs (RCV) scellée et préremplie, B ; Chargement des cartouches de réactifs (RCV) dans le portoir de cartouches (photo personnelle).	43
Figure 6: Table de travail d'un appareil EZ1 (photo personnelle).	43
Figure 7: qPCR (type CFX96TM, Bio-rad, California, USA) utilisé pour la détection de <i>Coxiella burnetii</i> dans les tissus placentaires (photo personnelle).	46
Figure 8: le thermocycleur utilisé pour la détection de <i>Coxiella burnetii</i> par PCR standard (photo personnelle).....	49
Figure 9: Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode (photo personnelle).	50
Figure 10: le séquenceur de type ABI Prism 3130 XL,Applied Biosystems, USA) utilisé pour le génotypage de <i>Coxiella burnetii</i> (photo personnelle).....	51
Figure 11: représentation des courbes d'amplification de gène IS1111 de <i>Coxiella burnetii</i> par RT-PCR (photo personnelle).....	58
Figure 12: représentation des courbes d'amplification de gène IS30A de <i>Coxiella burnetii</i> par RT-PCR (photo personnelle).....	59
Figure 13: Résultats obtenus lors de l'amplification d'ADN par PCR standard, révélés par migration sur gel d'agarose (photo personnelle).	61
Figure 14: représentation des courbes d'amplification de gène 23S rRNA spécifique pour la famille des Chlamydiaceae par RT-PCR (Photo personnelle).	63
Figure 15: représentation des courbes d'amplification de gène 16 S rRNA ciblé pour la recherche des Leptospires par RT-PCR (Photo personnelle).....	65

Liste des figures, des tableaux et des abréviations

Liste des tableaux

Tableau 1 : Amorces et sondes utilisées pour chaque gène cible pour la détection de <i>Coxiella burnetii</i> par PCR.....	5
Tableau 2: les groupes de génotypes MST de <i>Coxiella burnetii</i> identifiés en Russie à partir de différents échantillons (Glazunova et al. 2005).	9
Tableau 3: les groupes de génotypes MST de <i>Coxiella burnetii</i> trouvés en France à partir de différents échantillons (Glazunova et al. 2005),	11
Tableau 4 : les groupes de génotypes MST de <i>Coxiella burnetii</i> trouvés en Italie (Galiero et al. 2016).....	14
Tableau 5: les groupes de génotype MST de <i>Coxiella burnetii</i> identifiés en Espagne.....	15
Tableau 6: <i>Coxiella burnetii</i> génotypes MST identifiés chez l'homme et les ruminants échantillonnés lors de l'épidémie de fièvre Q, Pays-Bas, 2008-2010(Tilburg et al. 2012).....	16
Tableau 7 : Aperçu des génotypes MST de <i>Coxiella burnetii</i> obtenus à partir d'échantillons humains et animaux au Portugal (Santos et al, 2012).	17
Tableau 8 : les groupes de génotype MST de <i>Coxiella burnetii</i> identifiés en Slovaquie(Glazunova et al. 2005).	18
Tableau 9 : Prévalence de l'infection à <i>Coxiella burnetii</i> chez l'homme et l'animal en Afrique(Vanderburg et al. 2014).....	20
Tableau 10: les groupes de génotype MST de <i>Coxiella burnetii</i> trouvés aux Etats-Unis.....	24
Tableau 11: Méthodes conventionnelles de PCR pour les chlamydiae (Sachse et al. 2009)..	31
Tableau 12 : Méthodes de PCR en temps réel pour les chlamydiae (Sachse et al. 2009).	33
Tableau 13 : Espèce de <i>Leptospira</i> rapporté dans des cas de leptospirose aiguë humaine et animale pays africain (Allan et al. 2015).....	37
Tableau 14 : les wilayas concernés par la collecte des échantillons avec leurs coordonnées géographiques.....	Erreur ! Signet non défini. 9
Tableau 15 : Les amorces et les sondes utilisées pour PCR en temps réel dans cette étude (Mediannikov et al. 2010).	44
Tableau 16 : les amorces utilisées pour amplification par PCR standard et le séquençage des espaceurs de <i>coxiella burnetii</i> (Glazunova et al. 2005).....	47
Tableau 17 : méthode d'exploration de chlamydiae par PCR en temps réel (Sachse et al. 2009).....	53
Tableau 18 : les amorces utilisées pour l'amplification d'ADN par PCR standard pour le séquençage (Fukushi et Ochiai 2016).	53

Liste des figures, des tableaux et des abréviations

Tableau 19: résultats obtenus lors de détection de *C. Burnetii* par ER-PCR avec leurs valeurs cycle seuil..... **Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 20: les géotypes trouvés par séquençage des zones intergéniques (MST) dans les échantillons positifs..... **Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 21: Résultats obtenus lors de détection de chlamydia Spp par RT-PCR avec leurs valeurs cycle seuil. **Erreur ! Signet non défini.**

Liste des figures, des tableaux et des abréviations

Liste des abréviations

CCM	Complex <i>Coxiella</i> Medium
CDC	<u>Centers for Disease Control and Prevention</u> Centres pour le contrôle et la prévention des maladies)
CNR	Centre national de référence
CT	cycle threshold
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal Bovine Serum
<i>Icd</i>	isocitrate dehydrogenase gène
IS30A	insertion sequence
IS1111	insertion sequence
LCV	Large-Cell Variants
LPS	lipopolysaccharides de surface
MOMP	major outer membrane protein
MST	<u>Multi Spacers Typing</u> (séquençage des zones intergéniques)
OEA	ovine enzootic abortion (avortement enzootique ovine)
OIE	World Organisation for Animal Health
OMP	outer membrane protein
ORFs	<i>open reading frame</i>

Liste des figures, des tableaux et des abréviations

RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SCV	Small-Cell Variants
Spp	species plural
TBE	Tris/Borate/EDTA
UDG	uracile-ADN glycosylase
MST	Multi spacerstyping
IBR	La rhinotrachéite infectieuse bovine
IPV	et la vulvovaginite pustuleuse infectieuse
<i>FCO</i>	. La fièvre catarrhale ovine
BVD/MD	Diarrhée virale bovine/maladie des muqueuses (BVD/MD)
VD	domaines variables

Résumé

Résumé

L'avortement chez les ruminants représente une préoccupation économique importante pour les éleveurs. Les agents pathogènes, tels que, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia spp*, *Leptospira* spp, sont parmi les principales causes infectieuses de l'avortement et nécessitent un diagnostic rapide et fiable. L'importance de l'infectiosité de ces bactéries est également due à leur potentiel zoonotique, qui représente un risque constant pour la santé humaine.

La présente étude a été conçue pour rechercher la présence et le génotypage de *C. burnetii*, *Chlamydia spp* et *Leptospira* spp dans les tissus placentaires prélevés à partir des vaches laitières en cours de vêlage ou de l'avortement en Algérie, en utilisant la biologie moléculaire.

Un total de 77 fragments de tissus placentaires ont été prélevés chez des vaches laitières. 73 échantillons ont été prélevés chez des vaches ayant avortées et quatre échantillons ont été prélevés chez des vaches avec vêlages naturels durant une période de deux ans, de janvier 2013 à mars 2015 dans quatre wilayas à savoir Blida, Médéa, Bouira et Bordj Bou Arreridj du nord d'Algérie.

La présence de *Coxiella burnetii*, *Chlamydia spp*, et *Leptospira* spp dans ces échantillons a été établie par PCR en temps réel (RT-PCR), ciblant les gènes IS1111 et IS30 A pour la recherche de *coxiella burnetii*, le gène 23S rRNA pour la recherche des *Chlamydia spp* et le gène rrs (16 S) pour *Leptospira* spp. Les amplicons positifs ont ensuite été séquencés pour la détermination des génotypes circulant au sein de notre population bovine, pour *Coxiella burnetii* on a procédé à un séquençage des zones intergéniques (MST) en utilisant sept paires de séquences à savoir (Cox2, Cox5, Cox18, Cox37, Cox56, Cox57, et Cox61). Alors que pour les *Chlamydia spp* on a utilisé cinq paires d'amorces qui sont 16S1, 16S2 ; rRNA1a, rRNA1b ; rRNA01, rRNA02 ; rRNA03, rRNA04 ; rRNA4b, rRNA4a.

Quatorze échantillons placentaires (19,1%) ont été trouvés positifs pour *C. burnetii* par RT-PCR ; 9 (12,3%) à de Blida et 5 (6,84%) à de Médéa. Le génotypage des amplicons correspondants a montré une identité de 100% avec le génotype MST20, ce qui confirme la circulation de ce génotype dans les fermes laitières algériennes. Alors que pour les *Chlamydia* douze échantillons (16.4 %) ont montré des résultats positifs par RT-PCR tout essai de séquençage a échoué à l'exception d'un seul prélèvement et avec un seul gène qui a montré une similarité de 94% (102/109 pb) avec la souche de *Chlamydia psittaci*. Pour ce qui est des

Résumé

leptospiraSpp sa recherche par RT-PCR a donné un résultat négatif pour tous les échantillons utilisés dans cette étude

Abstract

Abortion in ruminants is an important economic problem. Pathogens bacteria, such as *Coxiella burnetii*, *Chlamydia spp*, and *Leptospiraspp*, are ranked among the most infectious causes of abortion that require rapid and reliable diagnosis. The importance of infectivity of these bacteria is also due to their zoonotic potential, which represents a constant risk to human health.

The present study was designed to search for the presence and the genotyping of *C. Burnetii*, *Chlamydia spp*, and *Leptospiraspp* in placental tissues collected from aborted and normal calving dairy cows in Algeria, using molecular tools.

A total of 77 placental tissue fragments were collected from dairy cows. 73 samples were collected from aborted cows and four samples were collected from natural calving cows over a period of two years from January 2013 to March 2015 in four provinces, which are Blida, Medea, Bouira et Bordj Bou Arreridj.

The presence of *C. burnetii*, *Chlamydia spp.*, and *Leptospiraspp* in these samples was screened by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), targeting two different genes, IS1111 and IS30 A for the research of *C. burnetii*, the gene 23S rRNA for *Chlamydia spp* and rrs (16 S) for *Leptospira spp*. The positive amplicons were subsequently sequenced to determine the circulating genotypes in dairy cattle, for *C. burnetii* the Multispacer Sequence Typing (MST) was chosen, using seven pairs of sequences (Cox2, Cox5, Cox18, Cox37, Cox56, Cox57, and Cox61). Whereas for *Chlamydia spp* five primer pairs were used which are 16S1, 16S2 ; rRNA1a, rRNA1b ; rRNA01, rRNA02 ; rRNA03, rRNA04 ; rRNA4b, rRNA4a.

Fourteen placental tissues (19.1%) were found to be positive for *C. burnetii* by qPCR; 9 (12.3%) from the city of Blida and 5 (6.84%) from the city of Medea. Genotyping of the corresponding amplicons displayed 100% identity with *C. burnetii* MST20 genotype, confirming the circulation of this clone in dairy farms from Algeria. While for *Chlamydia Spp* twelve samples (16.4%) showed positive results by RT-PCR all sequencing tests failed except for one sample and with a single gene that showed 94% similarity (102/109 pb) with *Chlamydia psittacistarum*

Résumé

Concerning *leptospiraSpp*, its search by RT-PCR gave à negative result for all the samples used in this study.

ملخص

الإجهاض في الحيوانات المجترة هو مصدر قلق اقتصادي مهم للرعاة مسببات الأمراض، مثل الكوكسيلا البورنيتية البريمية والمتدثرة و هي من بين الأسباب المعدية الرئيسية للإجهاض وتتطلب تشخيص سريع وموثوق. وترجع أهمية الإصابة بهذه البكتيريا أيضًا إلى انها حيوانية المنشأ ، والتي تمثل خطرًا ثابتًا على صحة الإنسان

صممت هذه الدراسة لاستقصاء وجود وراثية الكوكسيلا البورنيتية البريمية والمتدثرة في أنسجة المشيمة المأخوذة من أبقار الألبان أثناء الولادة أو الإجهاض في الجزائر باستخدام البيولوجيا الجزيئية..

تم جمع ما مجموعه 77 شظية الأنسجة المشيمة من الأبقار الألبان تم أخذ 73 عينة من الأبقار مع الإجهاض وأربعة عينات من الأبقار ذات العجول الطبيعي لمدة عامين، من يناير 2013 إلى مارس 2015 في أربع ولايات وهي البليدة ، المدية ، البويرة وبرج بوعريريج شمال الجزائر

تم تأكيد وجود الكوكسيلا البورنيتية البريمية والمتدثرة في هذه العينات من خلال PCR في الوقت الحقيقي (RT-PCR) ، واستهداف جينات IS30 A و IS1111 للبحث عن كوكسيلا بورنيتي ، الجين S rRNA23 للبحث الكلاميديا والجين S 16 للكشف عن البريمية

تم بعد ذلك تحديد تسلسل الأمبليكون الموجبة لتحديد الطرز الوراثة المتداولة في مجتمع الأبقار لدينا، وتم إجراء تسلسل المنطقة الوراثة لفيروس كوكسيلا بورنيتي (MST) باستخدام سبعة أزواج من المتواليات (Cox2, Cox5, Cox18, Cox37, Cox56, Cox57, et Cox61). في حين أنو المتدثرة استخدمنا خمسة أزواج من الاشعال 16S1, 16S2 ; rRNA1a, rRNA1b ; rRNA01, rRNA02 ; rRNA03, rRNA04 ; rRNA4b, rRNA4a.

تم العثور على 14 عينة من المشيمة (19.1 %) لتكون إيجابية الكوكسيلا البورنيتية بواسطة RT-PCR؛ البليدة 12.3) 9% (الو المدية 5 (6.84%) أظهر التتميط الجيني لأمبليكون المطابق هوية 100 % مع النمط الجيني MST20 مما يؤكد تداول هذا النمط الوراثي على مزارع الألبان الجزائرية بينما بالنسبة لكلاميديا اثنا عشر عينة (16.4%) أظهرت نتائج إيجابية بواسطة RT-PCR كل اختبار للتسلسل فشل باستثناء عينة واحدة وبجين واحد أظهر تشابهًا بنسبة 94% (102% / 109). (سنة مضت) مع سلالة الكلاميديا. psittaci.

بالنسبة إلى البريمية، أعطى بحث RT-PCR نتيجة سلبية لجميع العينات المستخدمة في هذه الدراسة

Introduction

Introduction

Coxiella burnetii est une bactérie de 0.4 à 1 µm de longue sur 0.2 à 0.4 µm large, à développement intracellulaire obligatoire qui se multiplie dans les cellules eucaryotes (Eldin et al. 2017), Bien que *C. burnetii* ait une paroi cellulaire similaire à celles des bactéries gram négatif ce qui la classe parmi leur groupe, elle n'est pas colorable par cette technique. Pour cela des colorations spécifiques ont été développées permettant de révéler ces bactéries, notamment la coloration de Gimenez(Eldin et al. 2017). Chez les femelles non gestantes, l'infection à *C. burnetii* est le plus souvent asymptomatique (Van den Brom, et al 2015). L'infection humaine se traduit souvent par l'inhalation d'aérosols infectés par *C. burnetii* (Eldin et al. 2017). Ceci se produit généralement après contact avec des animaux infectés ou avec leurs produits, l'infection se produit souvent durant le vêlage ou l'abatage des animaux infectés (Johnson et Kadull 1966), *C. burnetii* peut persister pendant de longues périodes dans le sol et le vent peut transporter les aérosols infectieux pour une distance de 30 Km au minimum (Eldin et al. 2017).

MST (Multi SpacersTyping) ou séquençage des zones intergéniques ; cette technique de génotypage a été introduite par Glazunova et al après avoir identifié 10 espaceurs(spacers) hautement variables situées entre ORFs (open reading frame) ce qui leur a permis d'identifier 30 différents génotypes et trois monophylétiques groupes parmi 173 isolats de *C. Burnetii* (Glazunova et al. 2005). La collection la plus diversifiée de *C. burnetii* est maintenue par Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection Marseille, France (Hornstra et al. 2011).

Le génotypage est une technique très discriminante et fréquemment utilisée pour retracer la propagation de *C. burnetii* entre différentes régions et des réservoirs animaux à l'homme (Eldin et al. 2017). Certains MST génotypes sont cosmopolites et se circulent dans les cinq continents tels que MST20 et MST16. Le MST8 a été décrit en Europe et l'Amérique du nord (Glazunova et al. 2005), alors que certains génotypes sont très spécifiques à un seul pays comme MST41 et MST49 qui ont été décrits en France uniquement (E. Angelakis et al. 2013), et le MST17 qui est le seul génotype circulant dans la Guyane française(D'Amato et al. 2015). Cette technique de génotypage permet l'investigation de l'origine géographique de chaque MST génotype et même fournie une cartographie de la diversité génétique de *C. burnetii*. Pour cela le génotypage par MST a été qualifié comme méthode de géotypage(Eldin et al. 2017).

Introduction

Pour ce qui est de spécificité de l'hôte, quelques génotypes MST ont été identifiés uniquement chez l'homme, tel que MST15 qui a été exclusivement identifié à partir des valvules cardiaques humaines (Glazunova et al. 2005). D'autres génotypes MST ont été identifiés chez différentes espèces animales, comme le MST16 qui a été découvert chez l'homme, les ruminants et même chez les arthropodes (Glazunova et al. 2005).

endémique et ne se traduit pas, dans la majorité des cas, par des signes cliniques les sources d'infection sont principalement les déjections mais aussi les fœtus, les annexes fœtales, les sécrétions utérines ou vaginales et le lait de femelles infectées. D'un autre côté il a été montré que *Chlamydia trachomatis* responsable de chlamydie humaine a peut-être pu franchir la barrière de l'espèce et devenu responsable d'avortement chez les bovins aussi selon l'étude menée par Ahmet ZBEK (Ozbek et al. 2008).

Concernant le genre *Leptospira*, qui est excrétées dans l'environnement via l'urine d'animaux réservoirs. L'homme se contamine par la peau ou les muqueuses (bouche, nez, yeux) lors de contact avec de l'eau ou des sols souillés, ou par contacts directs avec un animal infecté. Les personnes les plus à risque appartiennent à certains groupes professionnels (éleveurs, vétérinaires, éboueurs, agriculteurs..) (Emmanuel LEGRAND. 2009).

En outre, bien que les avortements d'origines infectieuses soient considérés comme un réel problème au sein d'élevages bovins laitiers en raison de sa perte économique, mais aucune étude de génotypage n'a été menée dans l'implication de ces bactéries dans ces cas d'avortements, par conséquent les génotypes circulants sont toujours inconnus en Afrique du Nord, y compris en Algérie.

Notre objectif était d'estimer la présence de *C. burnetii*, *Chlamydia Spp* et *leptospiraSpp* et la détermination de leurs génotypes dans les placentas des vaches ayant avorté ou des vaches avec vêlage naturel dans la région nord d'Algérie.

I. Les avortements

Du fait de leur impact économique et sanitaire, les avortements font depuis longtemps l'objet de l'attention des pouvoirs publics. En France, le Décret du 24 décembre 1964 « considère comme avortement dans l'espèce bovine l'expulsion du fœtus ou du veau né mort ou succombant dans les quarante-huit heures qui suivent la naissance ». Tout évènement répondant à cette définition doit être déclaré aux autorités. Un prélèvement de sérum maternel et des enveloppes foetales doit alors être effectué par le vétérinaire sanitaire de l'exploitation pour une recherche de brucellose (Noémie et al. 2010). Les avortements des ruminants font l'objet d'une surveillance obligatoire et doivent être déclarés et prélevés (placenta et prise de sang de l'avorteuse). En cas d'avortements successifs, les vétérinaires recommandent de faire des analyses sérologiques et par PCR du placenta ou de l'avorton. Des frais pris, en partie, en charge par les GDS. Certaines maladies étant transmissibles à l'homme (zoonose), le lait d'une vache ayant avorté ne doit pas être consommé. Les avortons et les délivrances doivent être rapidement collectés avec des gants et à mettre à l'équarrissage (et à l'abri des chiens ou d'autres animaux). Par ailleurs, les femmes enceintes doivent éviter de s'en approcher, et plus généralement éviter d'être présentes lors des vêlages.

Les principales causes d'avortements

- Maladies bactériennes

Brucellose, Salmonellose, Fièvre Q, Listériose, Leptospirose, Chlamydophilose, Campylobactériose, Uréaplasmosé, Arcanobacter, Bacillus licheniformis, Haemophilose, Mycoplasmosé, Ehrlichiose

- Maladies virales

Diarrhée virale bovine/maladie des muqueuses (BVD/MD)

La rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) et la vulvovaginite pustuleuse infectieuse (IPV) IBR-IPV

La fièvre catarrhale ovine FCO

- Protozootique

Toxoplasmos, Néosporose, Sarcosporidiose, Trichomonose génitale

- Avortement fongique

- Mycotoxines

La zéaralénone, Toxines de *Stachybotrysatra*, Toxines de *Penicillium roqueforti*, Phyto-oestrogènes(Noémieet al. 2010).

II. *Coxiella burnetii*

II.1. taxonomie

Coxiella burnetii partage plusieurs caractères avec rickettsia (bactérie de petite taille intracellulaire isolée à partir tiques), pour cela elle a été classée parmi la famille des *Rickettsiaceae*(Matr 2015). néanmoins, elle se distingue par de nombreuses caractéristiques telles que le pourcentage G + C (43%) (Emmanouil Angelakis et Raoult 2010) forte résistance dans le milieu extérieur, sa capacité de pousser dans le phagolysosome, sa réaction négative avec le test sérologique Weil-Félix et l'absence des éruptions cutanées (Maurin et Raoult 1999).

Cependant, des études phylogénétiques récentes, basées principalement sur l'analyse des séquences ARN 16S, ont montré que *Coxiella Burnetii* appartient au genre *Coxiella*, famille des *Coxiellaceae*, ordres des *Legionellales*, classe des *Gammaproteobacteria* et phylum *Proteobacteria*(Emmanouil Angelakis et Raoult 2010).

II.2. Bactériologie

Coxiella burnetii, bactérie intracellulaire stricte, pléomorphe, Gram-négatif. De 0.2–0.4 µm de largeur sur, 0.4–1.0 µm longueur, avec une membrane similaire à celles des bactéries à Gram négatif, *Coxiella burnetii* n'est pas colorable par la technique de coloration de gram, donc la méthode de Gimenez est souvent utilisée pour sa coloration dans les échantillons cliniques et les cultures cellulaires (Eldin et al. 2017).

Coxiella burnetii présente une variation morphologique entre une forme dite SCV, pour « Small-CellVariants », et une forme LCV pour « Large-CellVariants » ces dénomination ont été proposées par McCaul et Williams (1981) (McCaul et Williams 1981).

La forme SCV est représentée par de petits bacilles de 0,2 à 0,5 µm, denses et compacts au microscope électronique. Cette forme peut être extra ou intracellulaire. La forme SCV est une forme de résistance issue de cellules mères de type LCV. Elle infecte les cellules eucaryotes par phagocytose, se multiplie puis redonne la forme LCV. La forme LCV est représentée par de grosses cellules de forme arrondie, mesurant 0,7 x 2 µm, polymorphes, peu denses et exclusivement intracellulaire. Il s'agit d'une forme métaboliquement active,

présentant peu de lipopolysaccharides de surface (LPS) (Emmanouil Angelakis et Raoult 2010)(Emmanouil Angelakis et Raoult 2010).

II.3. Génétique.

On suppose le chromosome de *Coxiella burnetii* circulaire, et d'une taille variante de 2,103 kb (Lorenz, Jäger, et Willems 1998), selon la souche. La forme du chromosome reste incertaine s'il est linéaire ou circulaire. Cependant plusieurs recherches ont indiqué que le génome est linéaire (Lorenz, Jäger, et Willems 1998). *Coxiella burnetii* porte un petit chromosome circulaire d'environ cinq Mpb la majorité des souches contiennent additionnellement une des quatre variétés de plasmide de 32–51 Kpb, ce qui portent environ 2 % de l'information génétique, les souches dépourvues de plasmide contiennent à la place une séquence ressemblant à un plasmide de 16 Kpb intégrée dans le chromosome (Matr 2015).

En opposition à la C+ G % bactérienne qui est supérieure à 45 %, celui des *C. burnetii* a été déterminé d'être compris entre 43 et 45 %. La séquence tétranucléotidique CTAG est extrêmement rare, la similarité trinuéclotide CCG et CGG sont aussi rares dans le génome (Hunt, Ruffolo, et Rajakumar 1998).

III. Diagnostic de laboratoire

III.1. Collecte et stockage des échantillons

C. burnetii est un agent hautement infectieux. Donc, un personnel expérimenté portant des gants et des masques devrait manipuler des échantillons cliniques supposément infectés avec *C. burnetii* avec soin, et manipuler exclusivement dans les laboratoires de niveau de biosécurité 3 (Emmanouil Angelakis et Raoult 2010).

Amplification de l'ADN peut être accomplie à partir du lait, placenta, prélèvements de fœtus (en cas d'avortement), sang, liquide céphalorachidien, biopsie de la moelle osseuse, biopsie de la valvule cardiaque, greffe, biopsie osseuse ou biopsie hépatique (Fournier, Marrie, et Raoult 1998).

Le sang doit être prélevé dans des tubes EDTA ou citrate de sodium. Les échantillons solides doivent être conservés congelés à -80 ° C avant les tests (Maurin et Raoult 1999).

C. burnetii peut être cultivé sur un tapis cellulaire leucocytaire d'un sang hépariné.

III.2. Culture en milieu axénique ; CCM (ComplexCoxiella Medium)

Des études récentes ont montré que *C burnetii* peut être cultivée dans un milieu axénique développé par Hackstadt et Williams appelé ComplexCoxiella Medium (CCM) ce milieu soutient l'activité métabolique axénique par *C. burnetii* durant au moins 24 h. le milieu CCM contient 03 complexes sources nutriments (neopeptone, FBS (Fetal Bovine Serum), et RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) milieu de culture cellulaire. Et une grande concentration de chlorure (140 mM), et le tampon de citrate (PH approximativement 4.75) (Omsland et al. 2009).

III.3. Identification par biologie moléculaire

III.3.1. Réaction en chaîne par polymérase

Plusieurs amorces sont disponibles pour le diagnostic. Néanmoins, trois cibles génomiques sont le plus souvent utilisées pour la détection de l'ADN de *C. Burnetii* en RT-PCR qui sont les suivants :

❖ L'élément d'insertion IS1111 C'est cette dernière qui est la plus utilisée, la séquence présente en grand nombre offre une forte sensibilité. Selon les souches, ce nombre de copies varie de 7 à 110. Cette séquence code pour une seule fonction la transposase, une enzyme qui catalyse sa propre transposition (Cerveau, et al 2011). ces séquences d'insertion IS1111 sont des séquences d'ADN parasites ayant la capacité de se répliquer d'une manière autonome, de se proliférer et sauter vers d'autres loci au sein de son génome, mais aussi entre, des génomes bactériens (Siguier, Filée, et Chandler 2006).

❖ L' isocitrate dehydrogenase gène (*icd*), (Nguyen et Hirai 1999).

❖ La protéine de la membrane externe (outer membrane protein OMP) gène codant (*com1*) (Zhang et al. 1998). Plus de détails sont rapportés dans le tableau suivant

Revue bibliographique

Tableau 1: Amorces et sondes utilisées pour chaque gène cible pour la détection de *Coxiella burnetii* par PCR

gene	Amorces et sondes		sequences (5' -> 3')	Longueur des appliqueurs	References
<i>IS1111</i> importance épidémiologique	forward	sIS1pri_f	CGGGTTAAGCGTGCTCAGTAT	74	(Duron 2015)
	reverse	sIS1pri_r	TCCACACGCTTCCATCACCAC		
	probe (FAM)	Tqpro_sIS1	AGCCACCTTAAGACTGGCTACG GTGGAT		
Gene <i>icd</i>	forward,	icdpri_f	GACCGACCCATTATTCCT	139	(Rotterdam 2009)
	reverse,	icdpri_r	CGGCGTAGATCTCCATCCA		
	probe: FAM	Tqpro_icd	CGCCCGTCATGAAAAACGTGGT C		
Gene <i>IS30A</i> importance épidémiologique	Forward		CGCTGACCTACAGAAATATGTCC		(Mediannikov et al. 2010)
	Reverse		GGGGTAAGTAAATAATACCTTCT GG		
	Probe		CATGAAGCGATTTATCAATACGT GTATGC		
Gene <i>com1</i>	forward	compri_f	AAGCAATTAAAGAAAATGCAAA GAAATTAT	133	(Rotterdam 2009)
	Reverse	compri_r	ACAGAATTCATGGCTTTGCAAT		
	probe	Tqprocom	CACATTGATAATCGAAAAATTCA ACCAATG		
Gene <i>Cry1</i>	forward	Btpri_f	GCAACTATGAGTAGTGGGAGTA ATTTAC	132	(Rotterdam 2009)
	reverse	Btpri_r	TTCATTGCCTGAATTGAAGACAT GAG		
	probe (Cy5)	Tqpro_Bt	ACGTAAATACACTTGATCCATTT GAAAAG		

III.3.2. Typage de *Coxiella burnetii*

Pour le typage moléculaire, les signatures d'ADN basées sur les séquences sont largement utilisées car elles conduisent à des résultats non ambigus et éventuellement transférés entre les laboratoires. Pour cela, plusieurs techniques ont été développées pour

Revue bibliographique

génotyper et caractériser les souches de *C. burnetii*. Le séquençage des zones intergéniques (MST) (Astobiza et al. 2012) s'est avéré être une technique fiable, reproductible, et avec un pouvoir discriminant élevé. En outre, en raison de son non nécessité d'une culture préalable de la bactérie qui est très difficile et requiert un laboratoire de sécurité microbiologique P3, et peut-être appliquée sur des échantillons cliniques et / ou environnementaux.

Le séquençage des zones intergéniques (MST) est basé sur le séquençage de ces zones qui sont potentiellement variable, car elles sont soumises à une pression de sélection plus faible que les gènes adjacents. Les dix espaceurs suivants ont été choisis pour le typage et l'analyse par MST (Cox2, Cox5, Cox18, Cox20, Cox22, Cox37, Cox51, Cox56, Cox57, et Cox61) (Glazunova et al. 2005).

Les amplifications sont généralement réalisées dans les conditions suivantes :

Dénaturation initiale de 10 minutes à 95 ° C, ensuite 37 cycles de dénaturation sont réalisés pendant 30 secondes à 95 ° C, l'hybridation s'effectue pendant 30 secondes à 57°C, et l'élongation s'accomplit pendant une minute à 72°C (Glazunova et al. 2005).

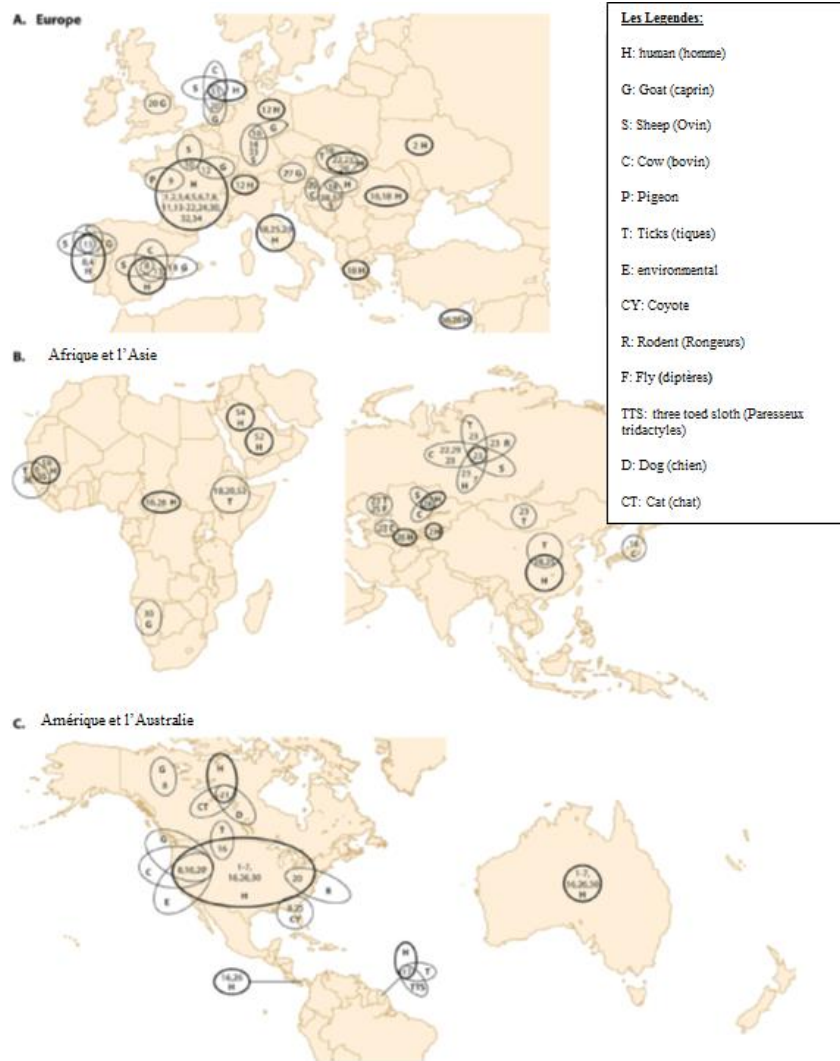


Figure 1: Distribution mondiale des différents génotypes MST identifiés dans des échantillons humaines animaux et environnementaux (Eldin et al. 2017).

IV. Distribution géographique

IV.1. En Europe

IV.1.1. La Russie

Selon les statistiques officielles russes, 11,058 cas de fièvre Q ont été rapportés pendant la période de 1957 à 1995, dans 37 territoires administratifs. La prévalence la plus élevée a été observée à Povolzhje (39%), Sibérie occidentale (31%), et dans le Chernozemje centrale principalement dans les régions d'Astrakhan (14%). En fait l'insuffisance de l'équipement de laboratoire fait de la fièvre Q sous-déclarée, ces infections parmi la population russe pourraient être acquises des caprins et des ovins, vu que les épidémies rapportées en Russie (la région de Novosibirsk, Voronezh, et Altai) ont été synchronisés avec une augmentation des nombres des ovins et des caprins (Maurin et Raoult 1999).

En Russie quatre MST génotypes (MST 2, MST 7, MST 23 et MST 25) rapporté d'être les génotypes circulants de *C. burnetii*. Le tableau 1 montre plus de détails sur les génotypes *C. Burnetii* MST en fonction de leurs types d'échantillons

Revue bibliographique

Tableau 2 : les groupes de géotypes MST de *Coxiella burnetii* identifiés en Russie à partir de différents échantillons (Glazunova et al. 2005).

Géotype MST	Origine	Nombre des souches dans chaque type d'échantillon	source Géographique	Nombre des géotypes identifiés
2	Sang humain	1	Russie	01
7	Sang humain	1	Leningrad, Russie, 1955 Leningrad, Russie, 1957	02
23	Tiques	1	Irkoutsk, Russie 1969	10
	Lait de vache	1	Leningrad, Russie, 1959	
	Viscères de souris Russet	1	Pskov, Russie	
	Sang humain	2	Oufa, Russie Vologda, Russie, 1987	
	placenta brebis (Abortion)		Oufa, Russie	
	<i>Ixodes ricinus</i>		Leningrad, Russie, 1962 Leningrad, Russie, 1959	
	<i>Cimex lecturalis</i>		Leningrad, Russie, 1959	
	Viscères d' <i>Apodemus flavicollis</i>		Leningrad, Russie, 1958	
25	Vaccine		Russie	01

IV.1.2. L'Allemagne

La fièvre Q est une maladie à déclaration obligatoire en Allemagne, 27 à 100 cas sont rapportés chaque année (Anonymous. 1997).

En 2005 et dans un quartier résidentiel surpeuplé de Jena (Allemagne). Une épidémie a été déclarée avec 331 cas pendant sept semaines ; 460 (75.7%) résidents parmi 608 ont participé à cette étude, d'un autre côté 101 personnes entre eux ont montré des signes

caractéristiques des cas aigus de la fièvre Q, ces données ont révélé une zone critique de résidence à moins de 500 m des troupeaux de brebis en gestation dans une zone urbaine (Boden et al, 2014). La moyenne d'âge de tous les participants était de 41 ans (intervalle de 14 à 89 ans) tandis que celui des cas de fièvre Q positifs était de 43 ans (intervalle de 15 à 77 ans). Le sex ratio homme / femme était de 1: 0,9 pour les cas de fièvre Q. les habitants testés ont été catégorisés selon les distances de leurs résidences aux zones de pâturage. Le nombre des cas de fièvre Q a été significativement plus élevé chez les personnes vivant à une distance d'environ 60 mètres aux zones de pâturage, par rapport aux personnes vivant à plus de 500 mètres (Boden et al. 2014).

En Allemagne six génotypes MST ont été rapportés à savoir ; MST 16, MST 18, MST 20, MST 24, MST 33 qui ont été identifiés dans des prélèvements d'origines animaux alors que MST 25, MST 32 provenaient des prélèvements d'origines humains), le MST 16 a été trouvé dans le lait de vache et le placenta de vache alors que le MST 18 a été détecté dans le placenta de chèvre et de brebis. Le MST 25 a été détecté dans le sang humain et le MST 32 dans une valve cardiaque humaine (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html).

IV.1.3. La France

La fièvre Q est estimée d'atteindre le niveau de 50 pour 100 000 habitants par an, ce qui représente 5% des cas diagnostiqués d'endocardite à l'échelle nationale (Tissot Dupont et al. 1992). Cette maladie était habituellement diagnostiquée dans le sud-est de la France vu que le Centre national de référence (CNR) pour les rickettsioses se trouve dans cette zone.

Dans l'étude de Diane Frankel et al (Frankel et al. 2011), 179, échantillons de sérums ont été analysés durant une période de janvier 1985 jusqu' à décembre 2009 ; 39,472 (30%) étaient séropositifs, au premier dépistage. Pour cela l'incidence mensuelle a été rapportée avec un pic pendant le mois d'Avril et Mai et des taux d'infection plus faibles sont observés entre octobre et janvier.

Revue bibliographique

Tableau 3 : les groupes de génotypes MST de *Coxiella burnetii* trouvés en France à partir de différents échantillons
(http://ifr48.timone.univmrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html). (Glazunova et al. 2005),

Génotype MST	L'origine	Nombre des cas trouvés dans chaque type de prélèvement	Nombre global des génotypes MST trouvés
1	Valve cardiaque humaine	05	25
	Sang humain	15	
	Abcès du psoas	01	
	Sérum Humain	01	
	placenta humain	03	
2	Valve cardiaque humaine	02	4
	Sang humain	02	
3	Valve cardiaque humaine	1	1
	Sérum Humain	02	
4	Valve cardiaque humaine	01	9
	Sang humain	06	
5	Valve cardiaque humaine	02	2
6	Valve cardiaque humaine	01	2
	Sérum Humain	01	
7	Valve cardiaque humaine		1
8	Valve cardiaque humaine	29	54
	Prothèse valvulaire	04	
	Sang humain	03	
	Thrombus	01	
	Sérum	01	
	placenta humain	01	
	Os humain	08	
	Biopsie aortique	01	
	Anévrisme	06	
9	Valve cardiaque humaine	04	5
	Disque vertébral	01	

Revue bibliographique

11	Prothèse valvulaire	01	4
	Valve cardiaque humaine	02	
	Sang humain	01	
12	Sang humain	03	14
	Prothèse valvulaire	02	
	Valve cardiaque humaine	06	
	abcès splénique	01	
	Abcès rétro-sternal	01	
	Anévrisme	01	
13	Végétation	01	02
	Sang humain	01	
15	Prothèse valvulaire	01	01
16	Sang humain	03	03
18	Sang humain	01	2
	Placenta humain	01	
20	Prothèse valvulaire	03	10
	Valve cardiaque humaine	05	
	épanchement liquidien intra-abdominal	01	
	Anévrisme	01	
21	Valve cardiaque humaine	01	2
	Sang humain	01	
22	Placenta humain		1
32	Biopsie aortique		1
33	Valve cardiaque humaine	05	8
		01	
	Ganglion		
	Sang humain	01	
	Anévrisme	01	
37	Valve cardiaque humaine	01	01
38	Abcès du psoas	01	02
	Valve cardiaque humaine	01	
39	Sang humain	01	01

Revue bibliographique

41	Sang humain	01	01
42	Valve cardiaque humaine	01	01
46	Valve cardiaque humaine	01	01
49	Valve cardiaque humaine	01	01
53	Caprins	01	01

La majorité de ces génotypes sont répartis dans tout le pays, mais il y a toujours la prédominance de certains génotypes basés sur certaines régions.

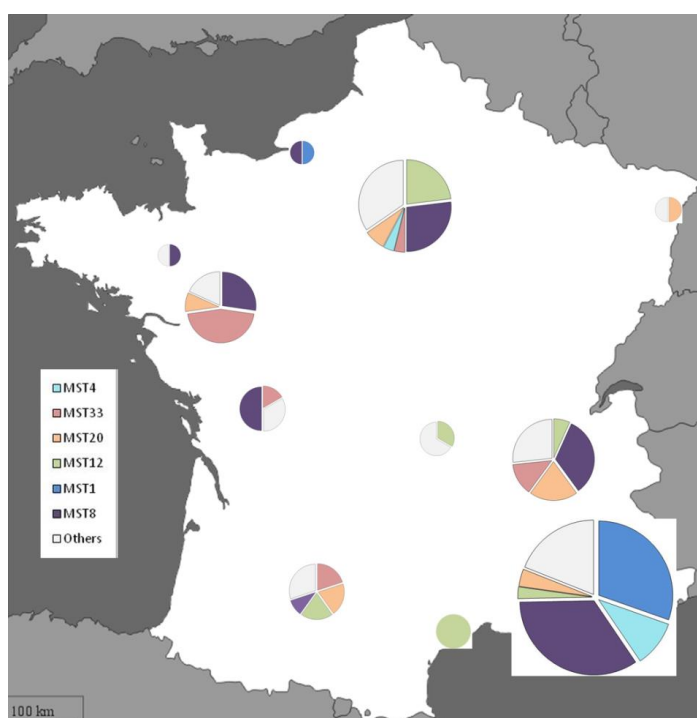


Figure 2: Répartition des différents génotypes de MST de *Coxiella Burnetii* en France (Sophie Edouard et al).

IV.1.4. Le Royaume-Uni

Selon les cas rapportés chaque année de fièvre Q par le Centre de surveillance des maladies transmissibles en Angleterre et au Pays de Galles, la maladie représente une incidence stable allant de 0,15 à 0,35 cas par 100 000 habitants par an (Halsby et al. 2017). 904 cas ont été signalés en Angleterre et au Pays de Galles entre 2000 et 2015. Le sex-ratio était estimé à 2,5: 1, l'âge médian était de 45 ans. deuxgroupes de génotypes MST ont été rapportés au Royaume-Uni, comme génotypes circulant le premier est le MST 20 détecté sur fœtus avorté, de chèvre, et le génotype MST 55 qui a été détecté sur la valve cardiaque humaine (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html).

IV.1.5. L'Italie

En Italie, 05 géotypes MST et un nouveau géotype MST (nouvelle combinaison) de *C. burnetii* ont été rapportés jusqu'à présent chez l'homme et les animaux qui sont détaillé dans le tableau suivant.

Tableau 4 : les groupes de géotypes MST de *Coxiella burnetii* trouvés en Italie(http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html) (Galiero et al. 2016).

	Géotype MST	L'origine	Source géographique
Prélèvements	MST 16	Sérum Humain	
d'origines		Sang humain	
humains	MST 29	Sang humain	
Prélèvements	MST 12 et	fromage produit à partir de	Toscane
d'origines	MST 32	lait de chèvre, de brebis et de	
animaux		vache	

Dans l'étude de Di Domenico et al, (2014)(Di Domenico et al. 2014), sur le profil MST de *C. burnetii* détecté dans des échantillons de lait, cette étude a démontré la présence d'une nouvelle combinaison allélique. Le profil MST est similaire à celui du type de séquence MST 20, à l'exception de la séquence Cox 57 dans laquelle une mutation T / A à la position 549 de l'allèle 6 est présent. Ces données suggèrent la présence d'un nouvel allèle et suggèrent la circulation de nouveaux géotypes de *C. burnetii* en Italie.

IV.1.6. L'Espagne

Le premier cas de fièvre Q en Espagne a été republié en 1950. Deux régions sont connues par leurs taux élevés ; dans la région basque (environ 60% ont acquis des pneumonies communautaires), et Navarre, le symptôme prédominant diagnostiqué dans le nord est la pneumonie alors que l'hépatite est habituellement observée dans le sud (<https://www.gideononline.com/2013/05/03/q-fever-in-spain/>).

Concernant les géotypes MST de *Coxiella burnetii* ; circulant en Espagne, 05 ont été identifiés à partir de différents échantillons d'origines humaines et animaux, plus de détails sont montrés dans le tableau suivant.

Revue bibliographique

Tableau 5 : les groupes de génotype MST de *Coxiella burnetii* identifiés en Espagne.

Génotype MST	type des échantillons	Nombre des souches trouvées de chaque type d'échantillons	Nombre Global des génotypes MST identifiés	Références
4	placenta Humain	05	01	http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html).
8	Valve cardiaque humaine	02	05	
	Placenta de chèvre	01		
	Placenta de brebis	01		
	Faces d'ovin	01		
13	Vaches laitières	01	06	(IanireAstobiza et al 2012)
	Lait de réservoir en vrac	01		
	Placenta de chèvre	02		
	écouvillon vaginal d'ovin	02		
18	Placenta de chèvre	01	01	
20	Placenta de chèvre	03	07	
	Lait de réservoir en vrac	01		
	Lait individuel	03		

IV.1.7. Les Pays-Bas

Pendant une période de 03 ans (de 2007 à 2010), La Hollande a fait face à la plus grande épidémie de fièvre Q jamais rapportée, vu que plus de 4 000 cas ont été signalés alors que 40 000 personnes auraient pu être infectées (Eldin et al. 2017). Malgré que l'épidémie est apparue parmi une population avec une faible séroprévalence (2.4%), les taux d'infection les plus élevés ont été observés dans la province du Noord-Brabant dans le sud du pays et les provinces de Gueldre et Limbourg (Roest et al. 2011).

En fait, le nombre élevé d'avortements dans les fermes environnantes des caprins pourrait être la principale source d'infection humaine dans ces provinces. La transmission aérienne des aérosols contaminés serait facilitée par le temps inhabituellement chaud et sec du printemps 2007 (Roest et al. 2011).

Le génotypage par MST aux Pays-Bas a montré que le MST 33 et le MST 01 sont les génotypes circulant chez les caprins, les ovins et l'homme. Cette découverte confirme le rôle

Revue bibliographique

de réservoir joué par les caprins et les ovins, et même son implication dans la transmission de la bactérie à l'homme (Tilburg et al. 2012).

Tableau 6 : *Coxiella burnetii* géotypes MST identifiés chez l'homme et les ruminants échantillonnés lors de l'épidémie de fièvre Q, Pays-Bas, 2008-2010 (Tilburg et al. 2012).

Hôte	Source	géotypes MST	Nombre de cas identifiés	Année
ovin	Ecouvillon vaginal	33	3	2008
agneau	Ecouvillon de gorge	33	3	2008
Homme	liquide broncho alvéolaire	33	1	2009
	Expectorations	33	5	2009
	valve aortique	33	1	2009
	valve aortique	33	1	2008
	valve aortique	33	1	2010
Caprins	Placenta	33	2	2009
	Placenta	20	1	2009
Bovins	Ecouvillonnage	20	1	2009
	Lait	20	5	2010
Homme	liquide broncho alvéolaire	Nouveau	1	2010
NA	DI	20	NA	NA
	DI	18		
	DI	16		
	DI	21		
	DI	8		

NA : n'est pas applicable, DI : données indisponibles

IV.1.9. Portugal

Au Portugal, la fièvre Q est considérée comme maladie à déclaration obligatoire depuis 1999. Ce qui est rapporté principalement dans les régions du centre et du sud. Elle est caractérisée par une faible incidence de 0.08 cas (2004-2008), et le nombre moyen de déclarations est de 0,10 cas pour 105 habitants. Cependant, cette faible incidence pourrait être due à une sous-estimation.

Revue bibliographique

Entre 2004 et 2005, 32 cas ont été diagnostiqués dans le Centre pour les vecteurs et les maladies infectieuses à l'Institut national de la Santé, mais seulement 12 cas uniquement ont été communiqués (Santos et al. 2012)(Anastácio, et al., 2013).

Tableau 7 : Aperçu des géotypes MST de *Coxiella burnetii* obtenus à partir d'échantillons humains et animaux au Portugal (Santos et al, 2012).

Hôte	Année	origine Géographique	Signes cliniques	Prélèvement Clinique	Géotype MST
Homme	2006	Faro	Pneumopathie	Sang	4
		Almancil	Maladie fébrile	Sang	
		Reguengos de Monsaraz	information non disponible	Sang	
		Alcoutim	Maladie fébrile	Sang	
	2010	Águas de Moura	Fébrile	Sang	
		Odivelas	Maladie fébrile/ insuffisance réna	Sang	
	2007	Fundão	Endocardite	Sang	
	2010	Amadora	Endocardite	Valvule bicuspid	8
	2007	Lisbonne	Endocardite	Valvule bicuspid	
caprins	2010	Ituero d'Azaba	Avortement	Foie fœtal	13

IV.1.11. Slovaquie

En Slovaquie, la fièvre Q a été décrite pour la première fois en 1954 lors de l'apparition d'une épidémie parmi des agriculteurs, la source de l'infection était les moutons importés de la Roumanie et parmi les travailleurs d'une usine de textiles exposés à du coton importé contaminé (Serbezov et al. 1999). En Slovaquie, cinq géotypes MST ont été détectés jusqu'à maintenant (tableau 7).

Revue bibliographique

Tableau 8 : les groupes de génotype MST de *Coxiella burnetii* identifiés en Slovaquie (Glazunova et al. 2005).

Hôte	année	Type de prélèvement	génotypesMST
Ixodes ricinus	1989		16
Homme	1945 1956	sang	18
<i>Haemaphysalis punctata</i>	1970		22
oiseaux sauvages	1945	Foie et rate	23
<i>Dermacentor marginatus</i>	1972		
Homme	1945	sang	29

IV.2. Afrique

En Afrique, la fièvre Q est fréquemment rapportée chez l'homme et de nombreuses espèces animales, selon les espèces et l'endroit la séroprévalence varie considérablement, malheureusement, les facteurs de risque et les estimations d'incidence sont mal comprises. Ainsi, la fièvre q est considérée comme une menace sous-estimée pour la santé humaine et animale en Afrique (Vanderburg et al. 2014).

La séroprévalence chez l'homme variait de 1% au Tchad à 32% dans un village du delta du Nil en Egypte. À Niamey, au Niger, 10% des enfants étaient séropositifs, et dans la région rurale d'Ashanti au Ghana, 17% des enfants de deux ans étaient séropositifs.

D'autres enquêtes épidémiologiques ont rapporté une séroprévalence humaine de 5% dans les zones rurales de l'ouest de la Côte d'Ivoire, de 8% parmi les nomades échantillonnés dans le nord du Burkina Faso et de 5% des femmes enceintes dans une clinique prénatale de Dar Es Salaam en Tanzanie (Vanderburg et al. 2014).

Les enquêtes épidémiologiques sur les bovins ont montré une séroprévalence allant de 4% à Dakar, au Sénégal, à 55% autour de la ville de Zaria, Nigeria. D'autres études rapportent une séroprévalence des bovins dans cet éventail les régions côtières du Ghana (18%), le Cameroun (Adamawa) (32%), le sud du Tchad (7%) et Transvaal (république Afrique du sud) (8%). La séropositivité des chèvres variait de 13% au Tchad à 23% en Egypte et 24% dans 8 Etats soudanais. Les enquêtes sur les moutons ont révélé des séroprévalences qui oscillaient

Revue bibliographique

de 11% au Tchad à 33% en Egypte. En Haute-Egypte, 23% des échantillons de sérums de chiens indiquaient une infection antérieure à *C. burnetii* (Vanderburg et al. 2014).

Le tableau 8 montre plus de détails sur les prévalences de la fièvre Q dans de nombreux pays africains en fonction de l'origine des échantillons.

Revue bibliographique

Tableau 9 : Prévalence de l'infection à *Coxiella burnetii* chez l'homme et l'animal en Afrique(Vanderburg et al. 2014).

région	Type d'étude	Pays	Espèces	Année (s) d'études	Échantillon	Nombre des positifs (%)
DuNord	Prévalence	Egypte	Chiens (150)	1998–1999	sérum	34 (23%)
			Buffle (45)	2012	sérum	0 (0%)
			bovins (54)			7 (13%)
			caprins (30)			7 (23%)
			ovins (55)			18 (33%)
			homme (92)			15 (16%)
			bovins (100)	2009	lait	22 (22%)
			homme (883)	1991	sérum	285(32%
		Soudan	caprins (460)	2010–2011	sérum	109 (24%)
	Maladie	Maroc	ovins avant l'avortement(115) et contrôles (156)	1986–1987	sérum	38(33%) et23 (15%)
			caprins et ovins avant l'avortement (118) et ovin contrôle (517)	1997	sérum	22 (12%) et 35 (7%)
		Tunisie	Chèvres et moutons ; avortement (72)	2009	produits de mise bas / liquides vaginaux	14 (19%)
			Homme maladie fébrile (300)	1993–1994	sérum	5 (2%)
			Homme maladie fébrile (47)	2004	sérum	4 (9%)
			Homme endocardites (98)	1991–2000	sang	1 (1%)
			Homme endocardite (33)	2008	sérum	1 (3%)
		Algérie	homme endocardite(61)	2000–2003	sérum	2 (3%)

Revue bibliographique

De l'Ouest	Prévalence	Nigeria	bovins (306) (84)	bovins (88) (169)	1983–1984	sérum lait	169 (55%) 44 (52%)
			bovins (88) (169)	bovins (88) (169)	1983–1984	sérum lait	48 (55%) 41 (24%)
			bovins (196)		2007–2008	sérum	7 (4%)
		Ghana	bovins (166)		2012	sérum	30 (18%)
		Cote d'Ivoire	Homme (949)		1965	sérum	44 (5%)
		Burkina Faso	Homme (1309)		1975	sérum	100 (8%)
		Niger	enfants (177)		1994	sérum	17 (10%)
		Ghana	enfants (219)		2008	sérum	37 (17%)
Maladie	Niger	Chèvres avant l'avortement (75) et contrôles (47)			1971–1972	sérum	24 (32%) et 12 (29%)
		Burkina Faso	Maladie humaine (183)	fébrile	1995	sérum	9 (5%)
moyen	Prévalence	Chad	bovins (193)		1985	sérum	13 (7%)
			Camelins (142)		1999–2000	sérum	114 (80%)
			bovins (195)			sérum	8 (4%)
			caprins (134)			sérum	18 (13%)
			ovins (142)			sérum	16 (11%)
			Homme (368)			sérum	4 (1%)
		Cameroun	bovins (1377)		2000	sérum	431 (32%)
	Maladie	Cameroun	Bovins avant l'avortement (116)		1968	sérum	0 (0%)
			Bovins avant l'avortement (490) et contrôle (193)		1985	sérum	14 (3%) et 13 (7%)
			Pneumonie humaine (110)		1991–1992	sérum	6 (6%)
			Pneumonie humaine (65)		1991–1993	sérum	6 (9%)

Revue bibliographique

Du sud	Prévalence	Afrique du Sud	bovins (8900)	1985–1986	sérum	692 (8%)
	Maladie	Afrique du Sud	bovins (6 fermes) et ovins (6 fermes) avortements	1972–1976	tissu foetal	12 (100%) fermes
			Pneumonie humaine	1987–1988	sérum	0 (0%) (92)
de l'est	Prévalence	Tanzanie	femmes enceintes (150)	1993	sérum	7 (5%)
	Maladie	Tanzanie	Homme maladie fébrile (483)	2007–2008	sérum	24 (5%)

IV.2.1. Ethiopie

Dans les pays africains, y compris en Éthiopie, l'implication de *C. burnetii* dans la maladie fébrile humaine est mal comprise en raison du manque de laboratoires développés (Kumsa, et al., 2015). Dans l'étude menée par Kumsa et al, deux différents génotypes de *C. burnetii* ont été identifiés chez les tiques, le premier génotype est le MST 18 alors que le deuxième génotype est le MST 20 (Kumsa, et al., 2015).

Cependant, les résultats trouvés par Kinga et al. Ont montré l'existence d'un nouveau génotype MST qui a été identifiés et proposés MST52 (Cinq souches découvertes) puisqu'une nouvelle combinaison a été trouvée, leurs allèles nouvellement identifiés sont 3-9-6-1-5-4-4-10-6-5 pour les espaceurs Cox2-Cox5-Cox18-Cox20-Cox22-Cox37-Cox51-Cox56-Cox57-Cox61. En fait, ce n'était pas seulement une nouvelle combinaison, mais un nouvel allèle a également été découvert, pour l'espaceur intergéniques Cox5, le Cox5.9 a été proposé. De plus, ce MST52 proposé n'était pas le seul génotype MST trouvé, mais le MST16 a également été identifié dans cette étude (Sulyok, Hornok, et al. 2014a).

IV.2.2. Sénégal

Au Sénégal, la fièvre Q devrait être considérée comme une menace pour la santé publique puisque l'excrétion de *C. Burnetii* par le lait maternel humain et les fèces a été prouvée (Mediannikov et al. 2010).

En effet, une séroprévalence de 24,5% a été estimée parmi une population testée dans un village rural, la bactérie a également été détectée par PCR chez 6 malades fébriles parmi 511, en plus une séroprévalence de 4% a été estimée chez les bovins (Eldin et al. 2017).

Le génotypage par MST effectué sur les souches de *C. burnetii* a montré la présence de MST6 dans les tiques dures de Niakhar, une provenant du Sine-Saloum et une du sud-est du Sénégal, en plus de trois isolats de tiques molles de la région de Kaffrine et de trois échantillons de selles de Dielmo et de Ndiop ont montré l'occurrence de MST36 (une nouvelle combinaison) (Mediannikov et al. 2010). Un autre nouveau génotype a été trouvé dans le sud-est du Sénégal (génotype MST 35) chez un patient infecté par *C. burnetii* (Emmanouil Angelakis et al. 2014).

Finement MST19 a été précédemment isolé chez un patient souffrant d'endocardite au Sénégal et est assez éloigné des nouveaux génotypes (Mediannikov et al. 2010).

IV.2.3. En Tunisie

En Tunisie, la prévalence de la fièvre Q chez les donneurs de sang est élevée (26%), ce qui est significativement plus élevé chez les hommes (28,3%) que chez les femmes (18,8%) ($P=0.03$). Cette étude a confirmé l'endémicité de la fièvre Q en Tunisie (Letaief et al. 1995). En Tunisie, le MST5 était considéré comme le génotype circulant puisque deux souches ont été identifiées dans la valve cardiaque humaine, en réalité ce génotype n'a été identifié qu'en Tunisie et en France (valve cardiaque humaine aussi) (Multi Spacers Typing Coxiella Database. [http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/groups.html] s. d.).

IV.3. Amérique

IV.3.1. États-Unis d'Amérique

La fièvre Q était considérée comme une maladie à déclaration obligatoire aux États-Unis en 1999 (Mcquiston et Childs 2002). Le nombre de cas de fièvre Q signalés aux CDC (centres pour le contrôle et la prévention des maladies) a augmenté, passant de 19 cas signalés en 2000 à 173 cas signalés en 2007, En 2008, des cas de fièvre Q ont été rapportés selon leurs formes (aiguë ou chronique). Aux États-Unis, le génotypage des souches identifiées à partir de différents types d'échantillons a conduit à l'identification de 14 génotypes MST rapportés comme étant les génotypes MST circulants. (Tableau 9)

Revue bibliographique

Tableau 10 : les groupes de génotype MST de *Coxiella burnetii* trouvés aux Etats-Unis.

Source	génotype MST	Nombre de cas trouvés	Région / Année	Reference
	1-7			(Eldin et al. 2017)
Os humain		1		[http://ifr48.timone.univ
Valve cardiaque humaine		2		mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/groups.html] n.d.)(Hornstra et al. 2011)
Placenta de chèvre	8	1	Terre-Neuve 19999	(Glazunova et al. 2005)
Chèvre avortée		1	Montana 1980	
Echantillon environnemental			Californie	(Hornstra et al. 2011)
prélèvement environnemental		6	Washington et Montana	(Kersh et al. 2013)
Sang humain		2	1938	(Glazunova et al. 2005)
Tique (D.Andersoni)	16	1	Montana 1935	(Sulyok, Hornok, et al. 2014b)
Lait de vache		2	Californie 1947 l'Ohio, 1956	(Glazunova et al. 2005)
				(Astobiza et al. 2012)
Disque intervertébral		2		
Valve cardiaque humaine	20	1		[http://ifr48.timone.univmrs.fr/mst/coxiella_burnetii/groups.html] n.d.)
Rongeur		1	L'Utah 1958	(Glazunova et al. 2005)(Tilburg et al. 2012)
Lait de vache		4	41 états	(Pearson et al. 2014a)
Biopsie Hépatique	21	1	Les montagnes Rocheuses	(Glazunova et al. 2005)
coyote	25			(Eldin et al. 2017)
Homme	26			(Hornstra et al. 2011)

anévrisme			[http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/groups.html] n.d.)
	42	1	

IV.3.2. Canada

C. burnetii a été signalé au Canada pour la première fois en 1952 par Pavilanis et son groupe lors qu'ils effectuaient une étude sérologique, 4,8% des sérums ont montré significatifs des titres d'anticorps contre *C. burnetii*. Alors que Marc-Aurèle et ses coéquipiers ont décrit le premier cas clinique en 1956 chez un agriculteur (Lang 1989).

La majorité des souches isolées jusqu'à maintenant au Canada appartiennent au génotype MST 21 puisqu'elles ont été identifiées dans l'utérus du chien et la valve cardiaque chez les trois membres de la famille. (Père, mère et fils) qui ont contracté la fièvre Q au cours de l'éclosion survenue en Nouvelle-Écosse en 1994 (D'amato et al. 2014).

IV.4. Asie

IV.4.1. Chine

La fièvre Q a été rapportée pour la première fois en Chine dans les années 1950 après avoir été. Diagnostiqué par sérologie (test de fixation du complément) chez un patient atteint d'une pneumonie atypique,

En Chine, deux génotypes MST ont été détectés : MST18 et MST25, les deux ont été trouvés dans des échantillons d'humains et de tiques (Eldin et al. 2017).

IV.4.3. Japon

La fièvre Q a été signalée au Japon pour la première fois en 1989 chez un médecin revenait d'études au Canada et qui a développé la fièvre Q, mais il n'était pas possible de savoir si le médecin avait été infecté au Japon ou au Canada (Watanabe et Takahashi 2008).

Au Japon, quatre souches de *Coxiella burnetii* ont été identifiées dans le lait de vache. Toutes appartenaient au MST16 (Glazunova et al. 2005).

V. *Chlamydia* revu historique et classification taxonomique

Bien que le premier rapport scientifique sur la chlamydiose aviaire remonte au 19ème siècle (Sachse et al. 2009). Et les *Chlamydia* ont été décrits pour la première fois comme les agents responsables de la conjonctivite il y a 100 ans (Sachse et al. 2009). Il a fallu plusieurs décennies avant qu'une nomenclature généralement acceptée ait évolué. Le terme «*Chlamydia*» (Grec = cloak), apparu dans la littérature en 1945. Avec l'avènement de la microscopie électronique et des techniques de culture cellulaire dans les années 1960, il devient évident que *Chlamydia* n'étaient pas un virus.

Les Chlamydiae sont des bactéries Gram négatif à localisations intracellulaires obligatoires. La famille des *Chlamydiaceae* comprend 11 espèces pathogènes pour les humains ou les animaux, certaines espèces pathogènes pour les animaux, comme *Chlamydia psittaci* qui est un pathogène aviaire, et peut être transmises à l'homme (Bachmann, et al., 2014).

V.1. Taxonomie

Le genre *Chlamydia* est classé dans la famille des *Chlamydiaceae* et l'ordre des Chlamydiales. Seules deux espèces étaient connues jusqu'aux années 1980 *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci*. Ces bactéries se distinguaient par des caractéristiques biochimiques, par leur morphologie et par leur cycle de multiplication.

Les souches de *Chlamydia trachomatis* ont été identifiées par leur capacité d'accumuler le glycogène dans l'inclusion cytoplasmique et leur sensibilité à la sulfadiazine. En revanche, les souches de *Chlamydia psittaci* n'accumulaient pas de glycogène et sont généralement résistantes à la sulfadiazine. Jusqu'en 1999, ce groupe de bactéries intracellulaires obligatoires comprenait quatre espèces *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, et *Chlamydia pecorum* (Herring 1993). Avec le développement de la biologie moléculaire et la caractérisation de l'acide nucléique en 1990, il est devenu évident que particulièrement *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci* représentaient des espèces plutôt hétérogènes, ceci avait trouvé son expression dans l'introduction de trois biovars et de 12 sérovars pour *Chlamydia trachomatis* et de 12 sérovars pour *Chlamydia psittaci*. De plus, l'hybridation ADN-ADN a montré une homologie de séquence remarquablement faible. La parenté entre les isolats de *Chlamydia psittaci* provenant de différents espèces animales hôtes variait de 93% à 30% (Sachse et al. 2009).

Une analyse approfondie des séquences d'ADN a conduit (K. D. E. Everett, et al., 1999) à réévaluer la parenté génétique dans l'ordre Chlamydiale et à proposer la reclassification

taxonomique, Selon cette proposition, la famille *Chlamydiaceae* comprend deux genres, *Chlamydia* et *Chlamydophila* avec un total de neuf espèces probablement associées à l'hôte, à savoir *Chlamydia trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. pecorum*, et *C. pneumoniae*. Cette classification avait initialement été basée sur les données de séquençage des gènes ARNr 16S et 23S, ainsi que le gène *ompA*, qui code pour La protéine majeure de la membrane externe de (MOMP). Plus tard, des données de séquence supplémentaires, basées sur les gènes de GroELchaperonin, KDO-transférase, smallcysteine-richlipoprotein et 60 kDa cysteine-richprotein (*ompB*), ont confirmé cette nouvelle taxonomie (Huang et al. 1997).

V.2. Importance médicale

La plupart des membres de la famille des *Chlamydiaceae* représentent des agents pathogènes pour l'homme et les animaux (Sachse et al. 2009). Les souches aviaires de *C. psittaci* provoquent la psittacose, ornithose, une maladie systémique caractérisée par des manifestations aiguës, prolongées, chroniques ou subcliniques chez les oiseaux psittacidés, les volailles domestiques et les oiseaux sauvages (Vanrompay, Haesebrouck 1995). L'infection est transmissible à l'homme, les symptômes étant en grande partie non spécifiques et ressemblant à une pseudo grippe, mais on sait également que la pneumonie, l'endocardite et l'encéphalite sont graves (Lsi 1990). L'avortement enzootique chez les ovins et les caprins, également appelé avortement enzootique ovin (OEA) ou avortement enzootique des brebis (EAE), est causé par *C. abortus*. La maladie a un impact économique majeur car elle représente la cause la plus importante de la perte d'agneaux chez les brebis dans certaines régions d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Afrique (Longbottom et Coulter 2003). Cette zoonose grave peut également toucher les femmes enceintes après un contact avec des brebis lors de l'agnelage, entraînant une maladie fébrile grave pendant la grossesse et la perte du fœtus (Pospischil et al. 2002). Chez les bovins, *C. pecorum*, *C. abortus* et *C. psittacise* trouvent en relation avec des infections des voies respiratoires et génitales, et peuvent causer des entérites, de l'arthrite, de l'encéphalomyélite ainsi que l'endométrite et l'infertilité (Sachse et al. 2009). En dehors des maladies chez les animaux mentionnés ci-dessus, les *chlamydiae* sont responsables d'un certain nombre de maladies chez l'homme, par ex. trachome, infection sexuellement transmissible de l'appareil génital (*Chlamydia trachomatis*), ainsi que l'infection respiratoire chez les adultes et les maladies cardiovasculaires (*C. pneumoniae*).

V.3. Infection chez les bovins

L'avortement bovin dû à *C. abortus* est similaire à l'avortement enzootique ovin, mais plus sporadique et moins commun (Borel et al. 2006). Les infections par *C. pecorum* comprennent une série de manifestations cliniques graves telles que l'encéphalomyélite bovine et l'endométrite purulente, entre autres. Des cas d'infection par *C. psittaci* ont également été signalés (Sachse et al. 2009). Des données récentes ont démontré que les infections subcliniques à *Chlamydia* par les deux espèces, *C. abortus* et *C. pecorum*, sont omniprésentes chez les bovines et souvent non détectées en raison des faibles sensibilités des techniques de diagnostic (Jee et al. 2004). De telles infections subcliniques se transforment parfois en une maladie clinique. Les anticorps spécifiques de *C. abortus* peuvent ensuite être directement détectés par des dosages spécifiques basés sur MOMP ou POMP (Niemczuk 2005). Comme aucun test spécifique de *C. pecorum* n'est disponible, la présence de ces anticorps ne peut être démontrée qu'indirectement.

V.4. Détection des *chlamydias*

Il convient de souligner qu'un diagnostic présomptif d'infection à *Chlamydia*, en particulier chez les animaux d'élevage et les volailles, peut souvent être établi sur la base des antécédents des élevages concernés, des symptômes cliniques et de la pathologie présentée. Subséquemment, ces facteurs ainsi que d'autres facteurs potentiels, tels que la possibilité d'autres agents infectieux ou de causes non infectieuses, doivent être pris en considération avant que les échantillons ne soient transmis pour analyse. Finalement, un diagnostic précis doit être confirmé par des examens de laboratoire. Étant des bactéries intracellulaires obligatoires, les *chlamydiae* nécessitent l'isolement et la propagation sur une culture cellulaire. Telle que la culture dans des lignées cellulaires ou des œufs embryonnés sont nécessaire pour démontrer la viabilité d'une souche et facilitent également la caractérisation détaillée par des méthodes moléculaires et biochimiques, largement considéré comme la technique de choix pour le diagnostic de *Chlamydia* (Thejls et al. 1994). Cependant, il existe des difficultés associées à cette technique qui ont encouragé le développement d'une grande variété de tests de détection directe et d'identification ciblant le LPS ou l'antigène protéique, les anticorps ou l'ADN.

Il existe essentiellement deux approches principales pour le diagnostic des infections à *Chlamydia* chez les mammifères et les volailles. La première implique la détection directe de

l'agent dans des échantillons tissulaires ou d'écouvillons alors que la seconde implique la recherche sérologique dans les échantillons de sang (Sachse et al. 2009).

V.4.1. Détection d'antigène

La présence d'antigènes dans les échantillons tissulaires ou à base des écouvillons peut être démontrée par la préparation et la coloration cytochimique des frottis.

Dans les laboratoires des maladies infectieuses, la détection d'antigène dans des échantillons des tissus cliniques (placentas provenant d'avortement) est généralement effectuée sur des échantillons de tissus fixés au formol ou fixés au formol et inclus en paraffine en utilisant diverses techniques de coloration histochimique et immunohistochimique. D'autres approches comprennent l'utilisation de diverses techniques immunologiques qui ont été développés, y compris ELISA et les tests d'anticorps fluorescents (FAT). Cependant, bien que ces tests démontrent avec succès la présence de *Chlamydia*, ils ne permettent généralement pas l'identification de l'espèce, du sérotype ou de la sous-espèce concernée (Sachse et al. 2009).

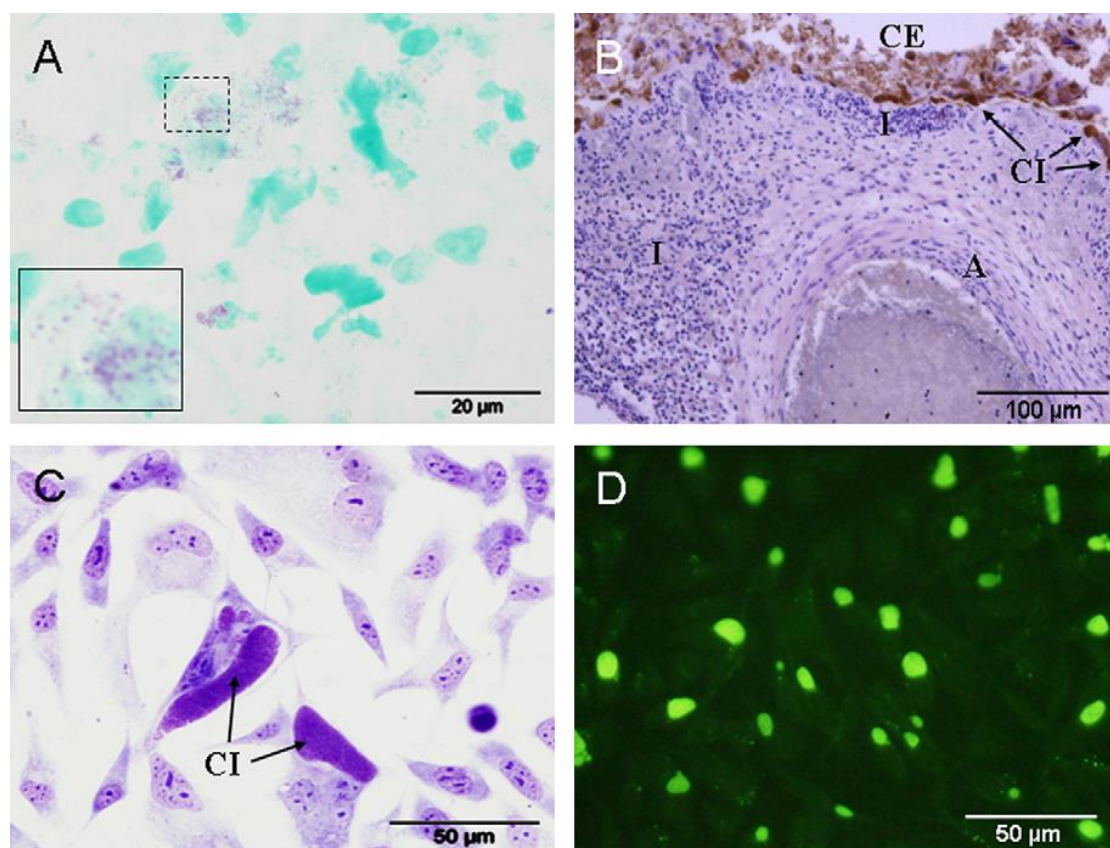


Figure 3: Exemples d'une technique de coloration utilisée pour diagnostiquer *C. abortus* responsable de l'avortement chez les ovins (Sachse et al. 2009).

V.4.2. méthode d'amplification par PCR

- **PCR Conventionnelle**

Les possibilités de détection rapide et spécifique des *chlamydias* se sont considérablement améliorées depuis l'introduction des méthodes moléculaires, en particulier la PCR, de nombreux protocoles de PCR ont été suggérés dans la littérature, résumant certains essais qui peuvent être pertinents pour les laboratoires de diagnostic vétérinaire. La majorité des méthodes de PCR conventionnelles publiées sont basées sur des cibles dans l'opéron de l'ARN ribosomal (K. D. E. Everett, Bush, et Andersen 1999), ou bien le *gene ompA* (Yoshida et al. 1998). Ce dernier code MOMP (La protéine majeure de la membrane externe) et héberge quatre VD (domaines variables), chacun d'entre eux est flanqué d'une région conservée. Alors que les déterminants antigéniques spécifiques au genre et à l'espèce sont codés par les régions conservées, les segments spécifiques au sérovar sont situés sur les domaines variables, principalement VD2 et VD4. Cette structure primaire hétérogène fait du gène *ompA* une cible idéale pour le diagnostic par PCR, ainsi que pour les tests de différenciation intra-spécifique.

Revue bibliographique

Tableau 11 : Méthodes conventionnelles de PCR pour les *chlamydiae* (Sachse et al. 2009).

Spécificité	Amorces (5'-3')	Tailles des Amplicons (bp)	Gène cible
<i>Chlamydiaceae</i>	16S-FCh : ACGGAATAATGACTTCGG 16S-RCh : TACCTGGTACGCTCAATT	436	16S rRNA
<i>Chlamydiaceae</i>	16SF2 : CCGCCCGTCACATCATGG 23R : TACTAAGATGTTTCAGTTC	585–600	16-23S région d'espacement
<i>Chlamydiales</i>	cIGS-1f : CAAGGTGAGGCTGATGAC cIGS-2r : TCGCCTKTCAATGCCAAG	352	16-23S région d'espacement
<i>Chlamydiaceae</i>	191CHOMP : GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGYGCI AC CHOMP371 : TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTTIAY GTG IGC IGC	576–597	<i>ompA</i>
<i>Chlamydiaceae</i>	cIGS-1f : CAAGGTGAGGCTGATGAC cIGS-1r : AGTGGTCTCCCCAGATTC	750	16-23S région d'espacement
<i>Chlamydiaceae</i>	Ch1 : ATGTCCAAACTCATCAGACGAG Ch2 : CCTTCTTTAAGAGGTTTTACC	603	<i>omp2</i>
<i>Chlamydiaceae</i>	16SF2 : CCGCCCGTCACATCATG 23R : TACTAAGATGTTTCAGTTC	585–600	16+23S rRNA
<i>Chlamydiales</i>	23SAPF2 : GAACCTGAAACCA(AG) TAGC 23APR : CTGGCTCATCATGCAAAAGG	92	23S
<i>Cp. felis</i>	23APFeF : CGGCGAGCGAAAGGGGATT	369	23S

Revue bibliographique

Spécificité	Amorces (5'-3')	Tailles des Amplicons (bp)	Gène cible
	23APFeIR : GGCACGCCGTCAACCATTG		
<i>Chlamydia psittaci</i>	CPS	100 :	16-23S région d'espacement
	CCCAAGGTGAGGCTGATGAC		
	CPS	111 : 101 :	
	CAAACCGTCCTAAGACAGTTA		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CTR70 :		16S rRNA
	GGCGTATTTGGGCATCCGAGTAACG		
	CTR71:	315	
	CAAATCCAGCGGGTATTAACCGCCT		
<i>Chlamydophilapneumoniae</i>	CPN	90 :	16S rRNA
	GGTCTCAACCCCATCCGTGTCGG		
	CPN	91 : 197	
	TGCGGAAAGCTGTATTTCTACAGTT		
	CpsiB		

• Real-time PCR

Un résumé des tests PCR en temps réel publiés pour les *chlamydiae* d'intérêt vétérinaire est donné dans le tableau 11. Contrairement aux tests de PCR standard discutés ci-dessus, la plupart des tests de PCR en temps réel spécifiques à la famille ciblent le gène de l'ARNr 23S. Les méthodologies développées par (Karin D.E. Everett, Hornung, et Andersen 1999)(Degraives, et al., 2003) et Ehricht et al. (2006) ont été validés et utilisés dans les recherches systématiques. Les limites de détection étaient de l'ordre d'une copie cible unique. cependant (Ehricht, et al., 2006) a souligné que la limite de détection réelle peut dépendre de l'intégrité de l'ADN cible. Alors qu'une seule copie cible clonée dans un plasmide a été détectée de manière reproductible, la limite de détection de l'ADN chromosomique de *Chlamydia trachomatis* était de 56 copies. Cet écart a été attribué aux ruptures de brins et à la dégradation partielle au cours de l'extraction de l'ADN de prélèvement clinique, ainsi que l'effet de l'encombrement stérique au cours de la réaction d'amplification enzymatique.

Revue bibliographique

Tableau 12: Méthodes de PCR en temps réel pour les *chlamydiae* (Sachse et al. 2009).

Spécificité	Amorces, sonde et séquences (5'-3')	Taille des Amplicons(bp)	Gène cible
<i>Chlamydiaceae</i>	TQF : GAAAAGAACCCTTGTTAAGGGAG	129-132	23S rRNA
	TQR : CTTAACTCCCTGGCTCATCATG		
	FAM-CAAAAGGCACGCCGTCAAC-TAMRA		
<i>Chlamydiaceae</i>	Ch23S-F: CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT	111	23S rRNA
	Ch23S-R: ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC		
	Ch23S-p: FAM-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-TAMRA		
<i>Chlamydiaceae</i>	CHL23SUP : GGGGTTGTAGGGTYGAGRAIAWRRGATC	168	23S rRNA
	CHL23DN : GAGAGTGGTCTCCCCAGATTCTACTA		
	CHL23LCR : LCR640- CCTGAGTAGRRCTAGACACGTGAAAC-phosphate		
<i>C. psittaci</i>	CpPsSSfor: TTATTAAGAGCTATTGGTGGATGCC	151	<i>ompA</i>
	CpPsSSrev: AACGTATAATGGTAGATGATTAATCTACCG		
<i>C. psittaci</i>	CppsOMP1-F: CACTATGTGGAAGGTGCTTCA	76	<i>ompA</i>
	CppsOMP1-R: CTGCGCGGATGCTAATGG		
	CppsOMP1-S: FAM-CGCTACTTGGTGTGAC TAMRA		
<i>C. psittaci</i>	F1-incA-Cpsi : GCCATCATGCTTGTTTCGTTT	74	<i>incA</i>
	R1-incA-Cpsi : CGGCGTGCCACTTGAGA		
	Cpsi-incA-NM : FAM TCATTGTCATTATGGTGATTTCAGGA-NFQ		
<i>C. abortus</i>	CpaOMP1-F: GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA	82	<i>ompA</i>
	CpaOMP1-R: ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA		

Revue bibliographique

Spécificité	Amorces, sonde et séquences (5'-3')	Taille des Amplicons(bp)	Gène cible
	CpaOMP1-S: FAMTAAATACCACGAATGGCAAGTTGGTTTAGCG- TAMRA		

V. *Leptospira* vu historique et classification taxonomique

La Leptospirose est l'une des infections zoonotiques les plus courantes et les plus répandues dans le monde et est reconnue comme une maladie négligée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Allan et al. 2015). La leptospirose est due à des bactéries Gram- appartenant à l'ordre des spirochètes. Leur morphologie distinctive, qui est à l'origine de leur appellation, est responsable de leur grande mobilité. Cette maladie dont l'agent a été isolé à la fin du XIX^{ème} siècle a été identifiée chez les bovins pour la première fois par Mikhin et Azinow (LEGRAND, 2009).

On sait qu'il existe dans le monde plus de 250 sérovars de *Leptospira* pathogènes, qui sont classés en 25 sérogroupes sur la base de leur phénotype sérologique (Allan et al. 2015)

Les sources d'infection chez l'homme et d'autres hôtes accidentels, tels que les bovins, les porcs, les chevaux et les animaux de compagnie sont des animaux sauvages et domestiques infectés de manière subclinique, quels sont les réservoirs de la maladie (Assenga et al. 2015)

Infection à *Leptospira* spp peut se produire de manière directe ou indirecte tels que l'exposition à des réservoirs animaux ou d'environnements contaminés aux patients infectés. Par exemple, il peut être transmis directement par exposition de plaies avec des tissus ou de l'urine d'animaux infectés, ingestion d'aliments et d'eau contaminée avec des rats infectés et l'inhalation d'aérosols de produits contaminés des fluides. Dans le même temps, il peut également être transmis indirectement via muqueuses (bouche, nez et yeux) avec sol ou eau contaminés par des bactéries (Chin 2019).

Chez les bovins, l'expression de la maladie est le plus souvent chronique. Il n'est pas rare

D'ailleurs d'observer essentiellement des formes succiniques. Cependant, la leptospirose est responsable de troubles de l'infertilité avec notamment des avortements mais aussi des

chutes de production laitière souvent accompagnées d'épisodes de mammites. Le bilan de la leptospirose peut donc être très lourd sur un plan économique (LEGRAND. 2009) .

La difficulté de diagnostic de la maladie couplée a son impact sur la santé animale aussi bien que sur la santé humaine nous a poussé à nous intéresser au statut actuel de cette maladie en France. Nous avons commencé, tout d'abord, par étudier l'agent pathogène responsable de la leptospirose. Puis, après avoir traité de l'épidémiologie de la maladie, c'est l'aspect clinique qui nous a intéressé avec notamment l'étude des symptômes, des lésions et les différentes étapes de l'examen en vue d'établir le diagnostic. Ensuite, nous présenterons les traitements et les méthodes de prévention. Dans un dernier temps, l'accent sera mis sur les risques encourus par l'homme (LEGRAND. 2009) .

V. 1.Bactériologie

• Taxonomie

Les leptospires ont pendant longtemps été considérées comme des protozoaires avant d'être

assimilés à la moitié du XX^e siècle à des spirochètes, un groupe de bactéries qui a divergé très tôt au cours de l'histoire de l'évolution de ces organismes. Les *Spirochetales* sont un ordre de bactéries se divisant lui-même en deux familles : les *Spirochaetaceae* et les *Leptospiraceae*. Au sein de la famille des *Spirochaetaceae*, se trouvent les genres *Treponema*, *Serpulina* et *Borrelia*. L'agent de la leptospirose, du genre *Leptospira*, appartient à la famille des *Leptospiraceae* (LEGRAND. 2009) .

Méthodologies de diagnostic pour les études de leptospiroses humaines

le test d'agglutination microscopique (MAT) est le plus couramment utilisé comme méthode de diagnostic des cas de leptospirose aiguë humains (Allan et al. 2015).

Des études chez l'humain ont montré que l'infection par la leptospirose est aussi diagnostiquée par hémoculture, associée à un diagnostic sérologique. la détection PCR ainsi que la culture et la sérologie Les cibles génétiques pour les analyses PCR de diagnostic comprenaient lbf1, lipL et ligA (Allan et al. 2015).

V.2. Prévalence de la leptospirose humaine

Dans les études de cohorte prospectives menées en milieu hospitalier en Afrique, qui ont inclus des patients atteints d'une maladie fébrile non spécifique et ayant utilisé la sérologie (MAT) pour le diagnostic de la leptospirose aiguë avec ou sans diagnostic complémentaire, la prévalence variait de 2 à 3% à 19,8% (Murray et al. 2011).

Une étude de cohorte prospective en milieu hospitalier portant sur patients fébriles à Mayotte ayant diagnostiqué la leptospirose aiguë par PCR et culture sans sérologie a signalé une prévalence de 13,7% (nombre de patients = 2523) (Huerre et al. 2010)

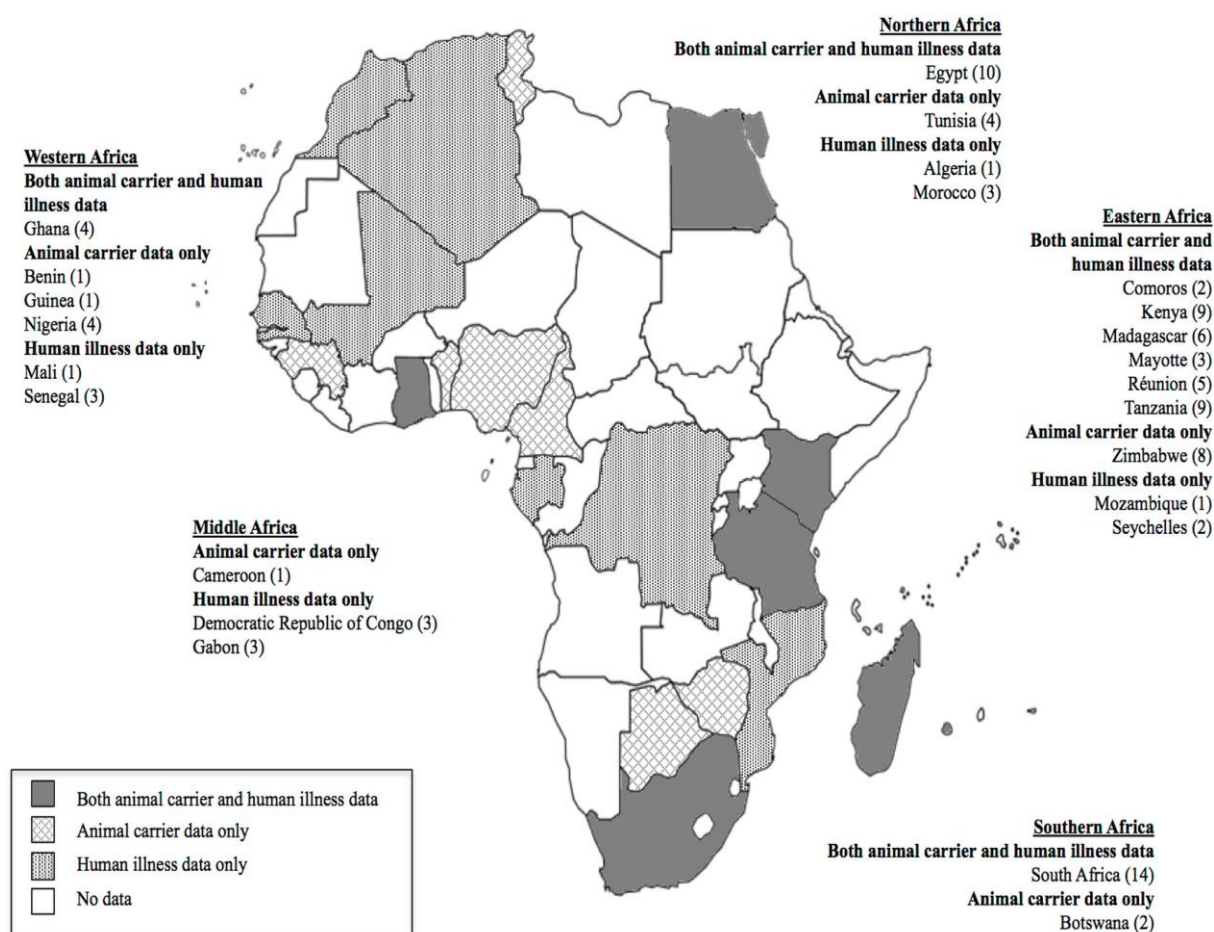


Figure 2. Répartition géographique de la leptospirose humaine aiguë et animale en Afrique (Allan et al. 2015).

Études de la leptospirose animale

Une infection à *Leptospira* spp chez des hôtes animaux a été rapportée par 51 citations décrivant des études réalisées dans 17 pays africains. Plus de détails sont rapportés dans le tableau suivant

Revue bibliographique

Tableau 13 : Espèce de *Leptospira* rapporté dans des cas de leptospirose aiguë humaine et animale pays africain (Allan et al. 2015).

Espèce	Études humaines	Études animales	
	Pays	Espèces de l'hôte	Pays
L. borgpetersenii	Kenya	rat roussard (<i>Arvicanthus niloticus</i>)	Nigeria
		rat noir (<i>Rattus rattus</i>)	Benin Egypte Mayotte
		bovins (<i>Bos spp.</i>)	Nigeria Afrique du Sud. Zimbabwe
		(<i>Rousettus oblivious</i>)	Comores
		cricétome des savanes (<i>Cricetomys gambianus</i>)	Tanzanie
		<i>chauve-souris</i> (<i>Eliurus minor</i>)	Madagascar
		<i>chauve-souris</i> (<i>Miniopterus spp.</i>)	Madagascar
		<i>chauve-souris</i> (<i>Otomops madagascariensis</i>)	Madagascar
	Mayotte	rat du Natal (<i>Mastomys spp.</i>)	Benin
		porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	Tunisie
		(<i>Microgales spp.</i>)	Madagascar
		Rat fouisseur à queue courte (<i>Saccostomys campestris</i>)	Kenya
L. borgpeterseni i ke	Mayotte	rat noir (<i>Rattus rattus</i>)	Mayotte
		petit mammifère insectivore (<i>Microgale cowani</i> , <i>Microgale dobsoni</i>)	Madagascar

Revue bibliographique

L. interrogans	Egypt	(Crociduraoliveri)	Benin
	Ghana	rat roussard (Arvicanthusniloticus)	Nigeria
	Kenya	Musaraigne des maisons (Suncusmurinus)	Madagascar
		Mangouste rayée (Mungo mungo)	Botswana
		rat noir (Rattusrattus)	Egypte Mayotte Madagascar
		rat marron (Rattusnorvegicus)	Madagascar Benin
		Bovins (Bos spp.)	Botswana, Nigeria, South Africa, Zimbabwe
	Mayotte		
		chauve-souris (Rousettusoblivious)	Comoros
		Souris grise (Mus musculus)	Kenya, Madagascar
L. kirschneri		porcs (Sus scrofa domesticus)	South Africa
		rat (Lophuromysikapusi)	Cameroon
	Egypt	rat roussard (Arvicanthusniloticus)	Kenya
	Kenya	rat noir (Rattusrattus)	Mayotte
		Bovins (Bos spp.)	Kenya Tanzania, Zimbabwe
		rat noir (Mus musculus)	Kenya
		Shrew (Crociduraspp.)	Benin
	Mayotte	Petit porc-épic (Hemicentetesnigriceps, H. semispinosus)	Madagascar

Partie expérimentale

I. Problématique

Du fait de leur impact économique et sanitaire, les avortements font depuis longtemps l'objet de l'attention des pouvoirs publics.

Le diagnostic de la cause de l'avortement passe par l'anamnèse, l'examen clinique et l'observation des lésions. Mais ceci ne conduit souvent qu'à des suspicions de maladie étant à l'origine de l'avortement : pour pouvoir déterminer avec certitude cette cause, il faut le plus souvent réaliser des examens complémentaires. Malgré toutes ces démarches mises en place pour diagnostiquer l'origine d'un avortement, 50 % des avortements n'ont pas d'origine identifiée.

Dans leur ensemble, les avortements peuvent avoir des causes variées : traumatique, toxique, agent infectieux parasite, bactérien ou viral. Dans notre étude, on va s'occuper par les infections bactériennes majeures à savoir Fièvre Q (*Coxiellaburnetti*), Leptospirose (*Leptospirahardjo*, *Leptospirapomona*), et Chlamydia (*Chlamydia psittaci*, *C. abortus* et *C. pecorum*) chez les bovins

II. Objectifs de l'étude

Cette étude a pour objectif :

1. détecter par technique de biologie moléculaire certaines bactéries responsables d'avortement chez les bovins à savoir :

- *Coxiella burnetii*
- *Chlamydia* ((*Chlamydia psittaci*, *C. abortus* et *C. pecorum*)
- *Leptospira* (*Leptospirahardjo*, *Leptospirapomona*)

2. Déterminer leurs prévalences parmi les cas d'avortement observés au sein de nos élevages bovins afin d'apprécier les pertes économiques dues à ces bactéries y compris les risques épidémiologiques et sanitaires représentés par nos cheptels bovins vu qu'ils sont considérés comme un réservoir potentiel pour *coxiella burnetii* et *leptospiraspp* et probable pour *Chlamydia trachomes*.

3. déterminer des génotypes circulants au sein de nos élevages bovins par techniques séquençage ou par MST (séquençage des zones intergéniques) des souches détectées, qui peuvent être à l'origine des cas d'avortement observés chez d'autres espèces (petits ruminants notamment) serait par conséquent responsable des cas humains de la fièvre Q et de leptospirose.

II.2. Cadre de l'étude et de collecte des échantillons :

Cette étude a été menée dans quatre wilayas du nord d'Algérie (tableau 12).

Pendant une période allant de mars 2013 jusqu' en Mai 2015, durant laquelle 77 prélèvements de placenta et 77 prélèvements de cotylédons ont été collecté et qui ont fait l'objet de prélèvements pour la recherche des bactéries ciblées par notre étude et mener une enquête descriptive exhaustive.

Tableau 14 : les wilayas concernées par la collecte des échantillons avec leurs coordonnées géographiques.

Wilaya	coordonnées géographiques	Superficie (km ²)
Blida	(36° 28' 0.12" N, 2° 49' 0.01" E),	1 575
Medea	(36° 16' 0.12" N, 2° 45' 0" E),	8 866
Bouira	(36° 21' 59.98" N, 3° 52' 59.99" E)	4 439
Bordj-Bou-Argeridj	(36° 4' 0" N, 4° 46' 0" E).	4 115

Ces wilayas se trouvent au nord centre d'Algérie et qui sont réputées par le nombre élevé des élevages bovins (figure 1).

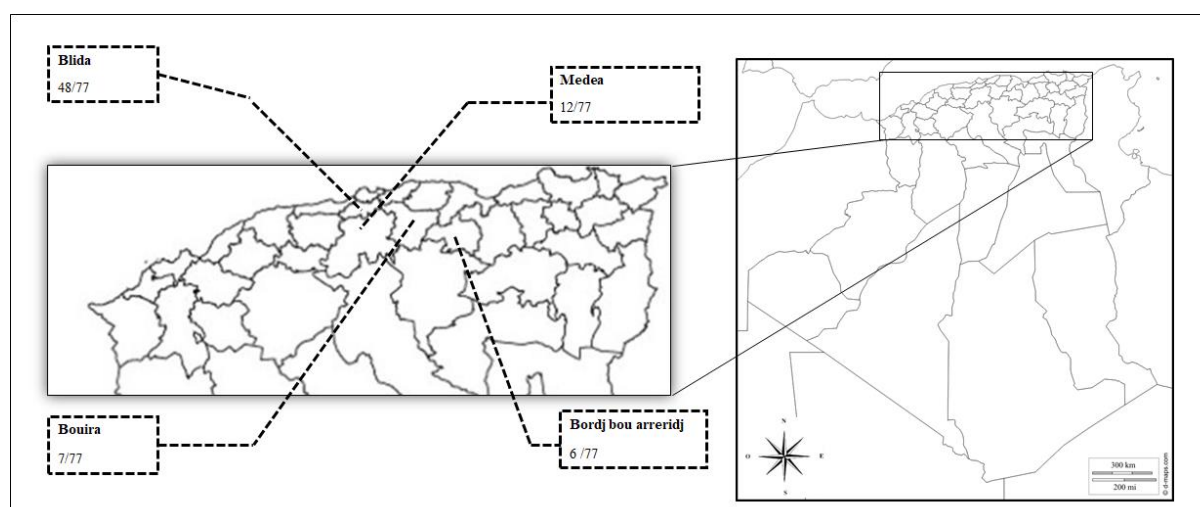


Figure 4 : distribution géographique des wilayas concernées par la collecte des prélèvements.

Pour ce qui est de la biologie moléculaire (extraction d'ADN, PCR en temps réel, et le génotypage) ces tests ont été réalisés au niveau delaboratoireAix-Marseille Univ, IRD, SSA, AP-HM, VITROME, IHU Méditerrané Infection, Marseille, France. Durant trois périodes distinctes ; la première du 16 mars jusqu'à 10 avril 2015, la deuxième ; du 20 juin jusqu' à 20 juillet 2016 et la troisième du 18 juin jusqu'à 1 aout 2017.

I. Matériel et méthodes

III.1. Prélèvement

Dans cette étude, nous avons formulé l'hypothèse que nos vaches échantillonnées étaient indemnes de brucellose vu que le cheptel algérien est déjà vacciné contre la maladie.

III.1.1. *Coxiella burnetii*

Critères évocateurs de la fièvre Q :

Critères épidémiologiques

- ✚ Avortements enzootiques à tout stade de gestation (plus souvent au cours du dernier tiers).

- ✚ Touche surtout les jeunes mères (Noémie. 2010)

Critères cliniques

- ✚ Maladie asymptomatique

- ✚ L'expression passe souvent par des vèlages prématurés, métrites épizootiques et parfois Non-délivrance (fréquente après avortement), commémoratifs d'infertilité au sein de l'élevage.

- ✚ Avortements, naissance de nouveau-nés affaiblis ou mort-nés

- ✚ Peut aussi prendre une forme grippale

- ✚ Mammites, troubles respiratoires (Boarbi, Fretin, et Mori 2016).

Critères lésionnels

Les lésions ne sont pas spécifiques à la fièvre Q.

III.1.2. Chlamydiasp (*Chlamydiapsittaci*, *C. abortus* et *C. pecorum*)

Critères épidémiologiques

- ✚ Avortements sporadiques (5% du troupeau avorte) au dernier tiers de la gestation (souvent 2 à 3 semaines avant le terme).

- ✚ Plus fréquemment sur les jeunes mères
- ✚ Surtout les femelles nouvellement introduites dans un cheptel (Noémie. 2010)

Critères cliniques

- ✚ Avortement suivi de métrite
- ✚ Commémoratifs de mortalité embryonnaire et métrite
- ✚ Cycles irréguliers (Khalil YOUSEF 2009).

Critères lésionnels

Lésions placentaires avec nécrose cotylédonnaire, épaissement du tissu intercotylédonnaire, présence inconstante d'un exsudat fibrino-purulent adhérent au chorion (Noémie. 2010).

III.1.3. Leptospirose (*Leptospirahardjo*, *Leptospirapomona*)

Critères épidémiologiques

- ✚ Avortements sporadiques ou épizootiques selon le sérovar³ à 10 % des femelles Du 4eme mois à la fin de la gestation
- ✚ les primipares comme les multipares sont atteintes (Noémie. 2010).

Critères cliniques

- ✚ Avortements précédés ou non d'hépatonéphrite (ictère jaune-franc), hyperthermie, entérite, suivis de non-délivrance et métrite, stérilité possible
- ✚ Possibilité de naissance d'un veau vivant et faible avec parfois des pétéchies à la surface des viscères thoraciques
- ✚ Photosensibilisation avec perte de lambeaux entiers d'épiderme chez les races à peau non pigmentée comme les Charolaises
- ✚ Teinte rosée du lait et chute de la production laitière

III.2. Technique de prélèvement

Les échantillons prélevés sont du type tissulaire, à partir de placenta pour la recherche des *coxiella burnetii* et *ChlamydiaSpp*(Hansen et al. 2011)(Borel et al. 2006), alors que les *leptospiraSpp* sont recherchées dans cotyledons(Noémie. 2010) issus d'avortement vu qu' ils représentent le prélèvement de choix pour la détection de ces bactéries par RT-PCR (c'est un ' un test recommandé par l' OIE.

Pour cela 77 prélèvements ont été collectés 73 après avortement (dans les 24 heures qui suivent l'avortement) et 04 prélèvements après vêlage naturel afin de les utiliser comme témoins négatifs (figure).

Matériel et Méthodes

Un fragment placentaire est prélevé aseptiquement et manuellement à partir de la lumière utérine afin d'éviter toute contamination de l'extérieur chaque prélèvement ($\approx 25 \text{ cm}^3$) et mise dans des tubes de 10 ml contenant de l'Alcool à (70°).

Ces prélèvements ont été gardés dans une température ambiante jusqu'au commencement de l'extraction de l'ADN.

III.3. Biologie moléculaire

III.3.1. Extraction d'ADN

Avant l'extraction d'ADN, toutes manipulations des échantillons biologiques ont été effectuées dans la Hotte à flux laminaire, chaque prélèvement de placenta ou de cotylédon a été rincé deux fois successivement dans l'eau distillée stérile pendant une durée de 15 minutes à peu près, ensuite desséché avec un papier filtre stérile (Kumsa, et al. 2015), chaque prélèvement a été coupé en un petit morceau ensuite écrasé manuellement en utilisant un pilon.

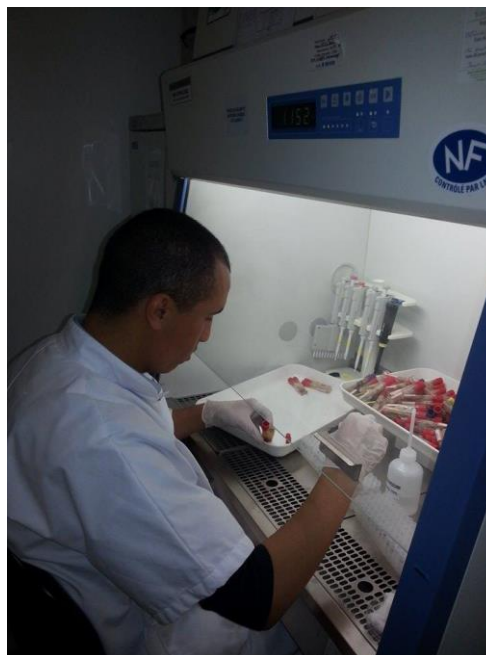


Figure 4: découpage des échantillons de placentas et de cotylédons sous une Hotte à flux laminaire (photo personnelle).

Après avoir récupéré une quantité d'à peu près 40mg d'homogénat ceci a été digéré dans 200 μL de tampon G2 plus 20 μL de protéinase K, le mixe a été incubé à une température de 56°C pendant 16 heures dans un Bains à sec chauffants, subséquemment une quantité de 200 μL d'homogénat a été transférée dans des tubes prélèvement (à fond plat) Ces homogénats

Matériel et Méthodes

ont fait l'objet pour l'extraction d'ADN. Cette tâche a été réalisée avec un kit commercial (EZ1® DNA Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)) sous forme des cartouches de réactifs scellés préremplies pour une configuration facile, Chaque puits de la cartouche (RCV) contient un réactif particulier, comme des particules magnétiques, un tampon de lyse, un tampon de lavage ou un tampon d'éluion (AVE) exempt de ribonucléases.

Suivant les instructions données par l'appareil l'ADN purs de haute qualité à partir de chaque prélèvement a été récolté et élués dans 100 µl of Tris EDTA (TE) buffer et conservé à une température de -20°C dans des conditions de stérilité absolue afin d'éviter toute type de contamination croisée entre les échantillons jusqu' à la réalisation de la PCR en temps réel

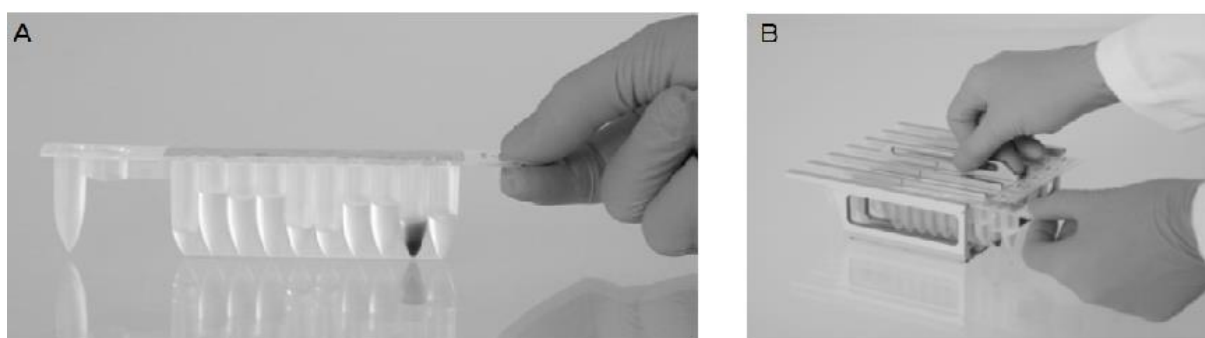


Figure 5: A ; Cartouche de réactifs (RCV) scellée et préremplie, B ; Chargement des cartouches de réactifs (RCV) dans le portoir de cartouches (photo personnelle).



Figure 6: Table de travail d'un appareil EZ1 (photo personnelle).

III.3.2. Détections par RT-PCR

III.3.2.A. *Coxiella burnetii*

Détection moléculaire de *Coxiella burnetii* par PCR en temps réel

Les échantillons d'ADN ont été testés individuellement par PCR en temps réel (RT-PCR) avec des amorces et des sondes désignées pour l'amplification du gène IS1111. Subséquemment, les échantillons positifs ont été confirmés par un espaceur spécifique pour l'espèce *Coxiella burnetii* (IS30A) (tableau 13).

Tableau 15 : Les amorces et les sondes utilisées pour PCR en temps réel dans cette étude (Mediannikov et al. 2010).

séquence cible		Orientation	séquence nucléotidique (5'-3')
<i>C.burnetii</i> éspa ceur IS1111	Amorces	Forward	CAAGAAACGTATCGCTGTGGC
		Reverse	CACAGAGCCACCGTATGAATC
	sonde	/	6FAM-CCGAGTTCGAAACAATGAGGGCTG-TAMRA
IS30A	Amorces	Forward	CGCTGACCTACAGAAATATGTCC
		Reverse	GGGGTAAGTAAATAATACCTTCTGG
	sonde	/	6FAM-CATGAAGCGATTTATCAATACGTGTATGC-TAMRA

Reconstitution et dilution des amorces pour qPCR :

Ces amorces et les sondes ont été reconstituées et diluées comme suivant :

Sonds 6 nmol :

- Le tube contenant la sonde lyophilisée a été centrifugé pendant 30 secondes
- 60 µl d'eau RnaseDnase free a été ajoutée
- La solution a été laissée 10 minutes à une température ambiante puis vortexé (comme ça on a eu une concentration de de la solution : 100 µM
- Une solution fille à 5 µM a été obtenu après une dilution au 1/20^{ème}.

Amorces

- La quantité en nmol (x nmol) a été repérée sur le tube afin d'ajouter une quantité x µl d'eau RnaseDnase free

Matériel et Méthodes

- laissée 10 minutes à une température ambiante puis vortexé (concentration de la solution : 1 nmol/ μ l soit 1000 μ M)
- Une solution fille à 20 μ M a été obtenu après une dilution au 1/50^{ème}.

Préparation de mix de qPCR (Mix ROCHE)

Le mix de qPCR a été préparé sous une hotte Biocap afin d'éviter tous types de contamination, selon les instructions du fabricant ; brièvement 3 μ l d'eau distillée stérile a été ajoutée à une quantité de 10 μ l de Mix roche (2x), par la suite un volume de 0.5 μ l de sonde (5 μ M), d'UDG, d'amorce F et d'amorce R (20 μ M) ont été ajouté au mix précédant.

Une solution finale de 15 μ l a été récoltée et distribuée dans des barrettes spécifiques de 8 cupules, finalement 0.5 μ l d'ADN a été ajouté pour avoir un volume finale de 20 μ l a été préparé. Pour ce qui est de témoins positif de 0.5 μ l d'ADN extrait à partir d'une culture positive de *Coxiella burnetii* a été utilisé, alors que 0.5 d'eau distillée stérile a été utilisé comme témoin négatif. Pour contrôler une éventuelle contamination durant les manipulations.

Pour la reaction de PCR en temps réel les barrettes ont été déposées dans un « FX96™ Real-Time PCR Detection System » le programme qPCR roche est détaillé ci-après

- Action UDG : 50 °C pendant 02 minutes
 - Dénaturation initiale : 95 °C pendant 05 minutes
 - Dénaturation : 95 °C pendant 05 secondes
 - Hybridation – elongation : 60 °C pendant 30 secondes
- } 39 cycles

Les résultats ont été considérés positifs dans le cas où la valeur CT était inférieure à 35

Programmation et Lancement de la qPCR

La plaque de PCR préalablement recouverte par un parafilm adhésif a été mise dans un appareil PCR en temps réel (qPCR CFX96™, Bio-rad, California, USA). Qui est piloté par un ordinateur permettant l'acquisition et le suivi des données y compris leurs traitement.

L'ADN de *C. burnetii* extrait de la culture bactérienne de la souche Nine Mile (Tick, USA) MST16 a été utilisé comme témoin positif.



Figure 7: qPCR (type CFX96TM, Bio-rad, California, USA) utilisé pour la détection de *Coxiella burnetii* dans les tissus placentaires (photo personnelle).

- **Séquençage des zones intergéniques (MST) :**

Pour ce qui est du génotypage des résultats positifs, parmi 77, 14 échantillons dont la valeur de CT inférieur à 35 ont été sélectionnés pour l'amplification par PCR standard. Les espaceurs dans le génome de *Coxiella burnetii* qui exhibent les variations les plus élevées pour une différenciation des génotypes à savoir (Cox2, Cox5, Cox18, Cox37, Cox56, Cox57, et Cox61 fabriqué par Eurogentec, Seraing, Belgium) ont été choisi pour cet objectif (tableau 14).

Matériel et Méthodes

Tableau 16 : les amorces utilisées pour amplification par PCR standard et le séquençage des espaceurs de *Coxiella burnetii* (Glazunova et al. 2005).

Nom de l'espaceur	ORF	séquence Nucléotidique (5'–3')	Taille des amplicons (pb)
Cox2	Hypotheticalprotein	Cox20766 CAACCCTGAATACCCAAGGA	397
	Hypotheticalprotein	Cox21004 GAAGCTTCTGATAGGCGGGA	
Cox5	Sulfatasedomainprotein	Cox77554 CAGGAGCAAGCTTGAATGCG	395
	Entericidin, putative	Cox77808 TGGTATGACAACCCGTCATG	
Cox18	Ribonuclease H	Cox283060 CGCAGACGAATTAGCCAATC	557
	DNA polymerase III, epsilon subunit	Cox283490 TTCGATGATCCGATGGCCTT	
Cox37	Hypotheticalprotein	Cox657471 GGCTTGTCTGGTGTAAGTGT	463
	Hypotheticalprotein	Cox657794 ATTCCGGGACCTTCGTTAAC	
Cox56	OmpA-liketransmembrane domainprotein	Cox886418 CCAAGCTCTCTGTGCCCAAT	479
	Conservedhypotheticalprotein	Cox886784 ATGCGCCAGAAACGCATAGG	
Cox57	Rhodanese-likedomainprotein	Cox892828 TGGAAATGGAAGGCGGATTC	617
	Hypotheticalprotein	Cox893316 GGTGGAAGGCGTAAGCCTTT	
Cox 61	Dioxygenase, putative	Cox956825 GAAGATAGAGCGGCAAGGAT	611
	Hypotheticalprotein	Cox957249 GGGATTTCAACTTCGATAGA	

Matériel et Méthodes

Reconstitution et dilution des amorces pour PCR standard :

Pour ce qui est de la reconstitution et dilution des amorces on a suivi le protocole suivant

- La même quantité en nmol (x nmol) d'eau RnaseDnase free a été ajouté à celle existait dans les tubes.
- Après l'avoir laissé 10 minutes à une température ambiante, la solution a été vortexé (concentration de la solution : 1 nmol/ μ l soit 1000 μ M).
- Une solution fille à 20 μ M a été obtenu après une dilution au 1/50^{ème}.

Préparation de mix de qPCR (Mix ROCHE)

Le mix a été préparé de la même manière que le mix de la PCR en temps réel (RT-PCR) (sous une hotte Biocap). Et selon les instructions du fabricant, brièvement : 17 μ l d'eau distillée stérile ont été ajouté à 25 μ l d'Ampli Taq Gold master Mix (ATG Master Mix), par la suite 1.5 μ l d'amorce F et d'amorce R ont été ajouté un mélange final de 45 μ l a été vortexé et distribué dans des barrettes spécifiques de 8 cupules. Une quantité de 05 μ l d'ADN a été distribuée dans chaque cupule sous une hotte Biocap réservée pour cet objectif et finalement. Dans une cupule, on a ajouté 05 μ l d'ADN extrait à partir d'une culture positive pour servir de témoin positif alors que 05 μ l d'eau distillée stérile ont servi comme témoin négatif dans une autre cupule.

L'amplification de l'ADN a été réalisée selon le programme PCR standard (ATG) détaillé ci-après.

- Dénaturation à une température de 95 °C pendant 15 minutes
- Dénaturation à une température de 95 °C pendant 30 secondes
- Hybridation à une température de 57 °C (Mediannikov et al. 2010) pendant 30 secondes.
- Elongation à une température de 72 °C pendant 1 minute.
- Elongation finale à une température de 72 °C pendant 5 minutes.



Figure 8: le thermocycleur utilisé pour la détection de *Coxiella burnetii* par PCR standard (photo personnelle).

Préparation de gel d'agarose 1.5%

Dans une bouteille en verre, on a pesé 3 grammes d'agarose, ensuite, on a ajouté 200 ml de tampon TBE 0.5X, la préparation a été fondue à la micro-onde et mélangé délicatement et versé dans un flacon de 50 ml. Un moyen gel a été préparé par l'ajout de 01 µl de SybrSafe, le tout a été mélangé délicatement aussi et coulé dans le support après avoir positionné le peigne. La polymérisation a été faite en 10 à 15 minutes à une température ambiante.

Électrophorèse et révélation

Après avoir ôté le peigne le gel et son support a été déposés dans la cuve de migration contenant du tampon TBE 0.5 X. 06 µl de produit de PCR ont été ajoutés à 02 µl de bleu de charge (Blue juiceloading buffer). Subséquemment, 06 µl de mélange ont été déposés dans un puit (dans le gel d agarose) (chaque prélèvement dans un puit. le premier puis a été réservés pour le dépôt de marqueur de poids moléculaire (2.5 µl sans ajouter de bleu de charge) alors que les deux derniers ont été réservés pour le témoin positif et le témoin négatif successivement.

La migration a été procédée à 135 volts pendant 20 minutes, et la lecture a été faite sous un transilluminateur UV.

Matériel et Méthodes



Figure 9: Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode (photo personnelle).

Purification du produit de PCR :

Après avoir ajouté 50 μ l d'eau distillée stérile au produit de PCR à purifier, la totalité du mélange a été déposé sur une plaque blanche *Machery Nagel*. Ensuite, la plaque a été mise en aspiration pendant 10 minutes, manomètre à 25 environ. Une fois aspirée la plaque a été séchée sur papier filtre avant d'ajouter 50 μ l d'eau distillée stérile. Après cette étape la plaque a été mise en agitation pendant 10 minutes à une vitesse de 600. Finalement, on a récupéré les 50 μ l de produit de PCR purifié dans un tube préalablement identifié.

Préparation de Mix de séquence

Cette préparation a été réalisée selon les instructions du fabricant, brièvement ; 1.5 μ l du tampon BDV1 et 0.5 μ l d'amorce 10 μ M ont été ajouté à 01 μ l de Bigdye, finalement 03 μ l d'eau distillée stérile ont été additionnés au mix précédent, sachant que dans ce type de réaction on a due préparer deux mix différents pour chaque échantillon, dans la première on a ajouté 0.5 μ l d'amorce F et dans la deuxième 0.5 μ l d'amorce R.

Un volume total de 06 μ l a été récupéré dans lequel on a additionné 04 μ l d'ADN purifié.

Le programme de la réaction de Mix a été établi comme suivant :

- 96 °C pendant 01 minute
- 96 °C pendant 10 secondes
- 50 °C pendant 05 seconds
- 60 °C pendant 03 minutes
- 15 °C + ∞

Matériel et Méthodes

Préparation de la Plaque de Séphadex

Dans une plaque noire, on a mis de la résine afin de remplir les puits (le surplus a été éliminé), ensuite, on y posé une plaque *Millipore MAHV5*. Par la suite, on la calé en butée puis on la retourné le tout pour faire tomber la résine dans les puis. Finalement 300 µl d'eau distillée stérile ont été ajoutés pour laisser gonfler la résine pendant 02 heures 30 minutes dans une température ambiante.

Purification de la réaction de séquence

La plaque de Séphadex préalablement préparée a été centrifugée après l'avoir posée sur une plaque « poubelle » afin d'éliminer l'excédent d'eau pendant 02 minutes à 1238 g ensuite cette plaque de Séphadex a été posée sur une plaque *MicroAmpN801-560* précédemment identifiée. Après cela 10 µl d'eau distillée stérile ont été additionnés aux produits de séquence, la totalité (20 µl) a été déposée bien au centre des mini colonnes de la plaque de Séphadex et sans touché la paroi et centrifugé le tout avec couvercle pendant 05 minutes à 1238 g. finalement cette plaque *MicroAmp* peut être placée dans le séquenceur ABI Prism 3130 XL, Applied Biosystems, USA).

Cette plaque a été fermée hermétiquement avec un couvercle spéciale (MicroAmp 96-Well Full plate adapter for the ABI Prism 3130 Genetic Analyser).



Figure 10: le séquenceur de type ABI Prism 3130 XL, Applied Biosystems, USA) utilisé pour le génotypage de *Coxiella burnetii* (photo personnelle).

Lancement de réaction de séquençage

L'ensemble plaque avec son adaptateur a été placé sur le support de plaque de séquenceur capillaire ABI Prism 3130 Genetic Analyser XL, Applied Biosystems, USA). Pour ce qui est du lancement, programmation, identification des plaques la création d'une plaque, la programmation et l'identification des runs tous ces étapes ont été réalisées selon le guide d'utilisation affiché sur le séquenceur.

Génération, assemblage et correction des séquences :

Finalement toutes les séquences générées ont été assemblées et corrigées avec un logiciel ChromasPro 1.7 software (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). Alors que les Génotype MST ont été déterminés par comparaison avec les différents Génotype MST inclus dans la base des données contenant les génotypes MST de *Coxiella burnetii* détectés en Europe et dans d'autres pays autour du monde (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html).

III.3.2.B. Chlamydia Spp

Pour ce qui est du *chlamydia Spp*, on a suivi le même protocole expérimental que celui de *Coxiella burnetii* cependant ce qui fait la différence, c'est le types des amorces et des sondes utilisées pour l'identification des souches par PCR en temps réel et les amorces utilisées pour le séquençage par conséquent, on va détailler uniquement les types des amorces et les programmes d'amplification d'ADN par PCR standard vu que le reste du protocole est le même que celui détaillé antérieurement.

Détection moléculaire de Chlamydia Spp par PCR en temps réel

Le gène ciblé est le 23 S spécifique pour toute la famille des *Chlamydiaceae* codant pour rRNA. Cette technique a été développée par Everett et al. (1999b), et Ehrlich et al. Ensuite validées et utilisées dans la recherche systématique des *Chlamydias*, les amorces et les sondes utilisées dans cette recherche sont détaillé dans le tableau suivant :

Matériel et Méthodes

Tableau 17 : méthode d’exploration de *Chlamydiae* par PCR en temps réel (Sachse et al. 2009).

Spécificité	Amorces et sonde (5’-3’)	Taille des Amplicons (Pb)	Gene ciblé
<i>Chlamydiaceae</i>	Ch23S-F : CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT	111	23S rRNA
	Ch23S-R : ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC		
	Ch23S-p: FAM-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-TAMRA		

- **Le séquençage des résultats positifs par RT-PCR :**

L’amplification par PCR standard du gène 16 S codant pour fragment d’ARN ribosomal a été réalisée en utilisant une paire d’amorces (tableau6).

Tableau 18 : les amorces utilisées pour l’amplification d’ADN par PCR standard pour le séquençage (Fukushi et Ochiai 2016).

Primer “	Positions	Séquences
16S1	-2 to 18	5’-CGGATCCTGAGAATTTGATC-3’
16S2	1554 à 1537	5’-TGTCGACAAAGGAGGTGATCCA-3’
rRNA1a	-1 à 21	5’-GGATCCTGAGAATTTGATCITG-3’
rRNA1b	547 à 523	5’-TCCGTATTACCGCAGCTGCTGGCAC-3’
rRNA01	523 à 547	5’-GTGCCAGCAGCTGCGGTAATACGGA-3’
rRNA02	742 à 718	5’-GCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCAC-3’
rRNA03	886 à 912	5’-TATGCCGCCTGAGGAGTACACTCGC-3’
rRNA04	1076 à 1052	5’-TGACGACAGCCATGCAGCACCTGTG-3’
rRNA4b	1077 à 1099	5’-GCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGGTTA-3’
rRNA4a	1554 à 1534	5’-TGTCGACMGGAGGTGATCCAGCC-3’

Matériel et Méthodes

Finalement l'amplification de l'ADN a été réalisée selon le programme PCR standard (ATG) détaillé par (Fukushi et Ochiai 2016) :

- Dénaturation à une température de 94 °C pendant 03 minutes
- Dénaturation à une température de 94 °C pendant 01 minute
- Hybridation à une température de 40 °C pendant 01 minute (Mediannikov et al. 2010).
- Elongation à une température de 72 °C pendant 02 minutes.
- Elongation finale à une température de 72 °C pendant 10 minutes.

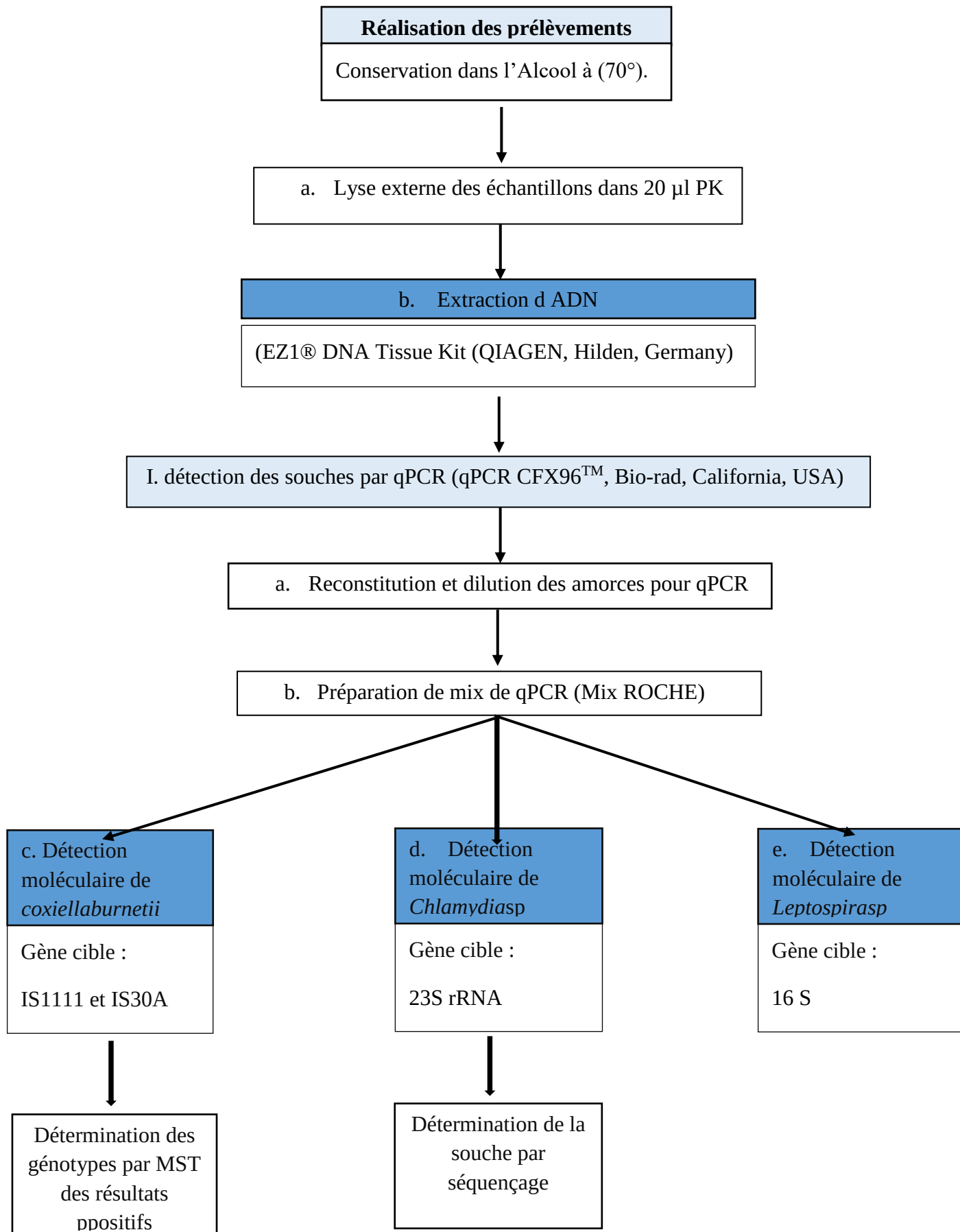
III.3.2.C. *Leptospirasp* (*Leptospirahardjo*, *Leptospirapomona*)

Les amorces utilisées pour la recherche des leptospiraspp par PCR en temps réel sont les suivant : Lepto F (5'171 CCCGCGTCCGATTAG 3'), et Lepto R (5'258 TCCATTGTGGCCGRA/GACAC3'), ces séquences se localisent entre la position 171 et 258 du gène rrs (16 S) dont le produit d'amplification donnent des séquences de 87 pb. Pour ce qui est de la révélation, on a utilisé la sonde suivante :

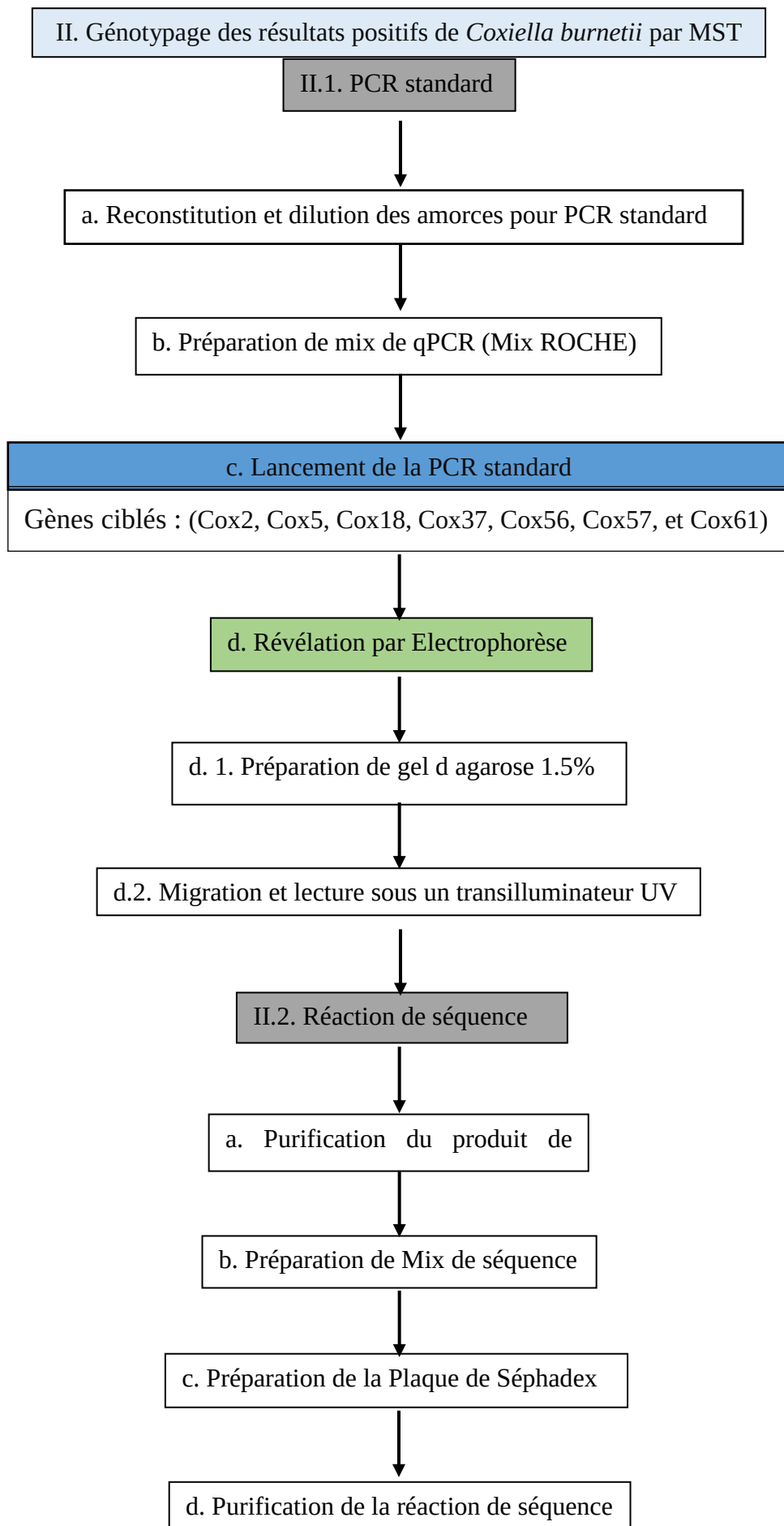
[5'205(FAM) CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC228 3' (TAMRA)] (Smythe et al. 2002).

Matériel et Méthodes

Organigramme du protocole expérimental



Matériel et Méthodes



Matériel et Méthodes

II.3. Lancement de séquençage ABI Prism 3130 XL, (Applied Biosystems, USA).



Génération, assemblage et correction des séquences on ChromasPro 1.7 software (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia).



Détermination de Génotype MST en utilisant la base des données MST



III. séquençage des résultats positifs de *chlamydia sp*



Même protocole de séquençage que celui de *Coxiella burnetii*



c. Lancement de la PCR standard

Gènes ciblés :

(16S1, 16S2/ rRNA1a, rRNA1b/ rRNA01, rRNA02/ rRNA03, rRNA04/ rRNA4b, rRNA4a).

Résultats

IV. Résultats :

IV.1.1. Détection de *Coxiella burnetii* par PCR en temps réel (RT-PCR) :

Parmi les 73 échantillons qui ont été collectés dans les quatre wilayas Blida (N = 48), Médéa (N = 12), Bouira (N 146 = 7) et Bordj-Bou-Argeridj (N = 6). Quatorze échantillons ont montré un résultat positif par RT-PCR ce qui fait 19.1 % de tous les échantillons, parmi ces positifs, neuf ont été détectés à Blida et cinq à Médéa, de plus deux échantillons ont été fortement chargés par *Coxiella Burnetii* avec un cycle seuil (CT value cycle threshold) inférieur à 22 (16.2 et 21.2 ce qui correspondant à 9.0 et 7.5 log 10 copies d'ADN/mL d'échantillons respectivement). Cependant tout le reste des échantillons positifs ont été modérément chargés par *Coxiella burnetii* correspondant à 5.3 et 4.1 log₁₀ copies d'DNA /mL de prélèvement respectivement. Alors que les échantillons prélevés à Bouira et à Bordj-Bou-Argeridj (N= 13) ont tous montré un résultat négatif, du même pour les échantillons prélevés après vêlage naturel qui ont aussi été négatifs.

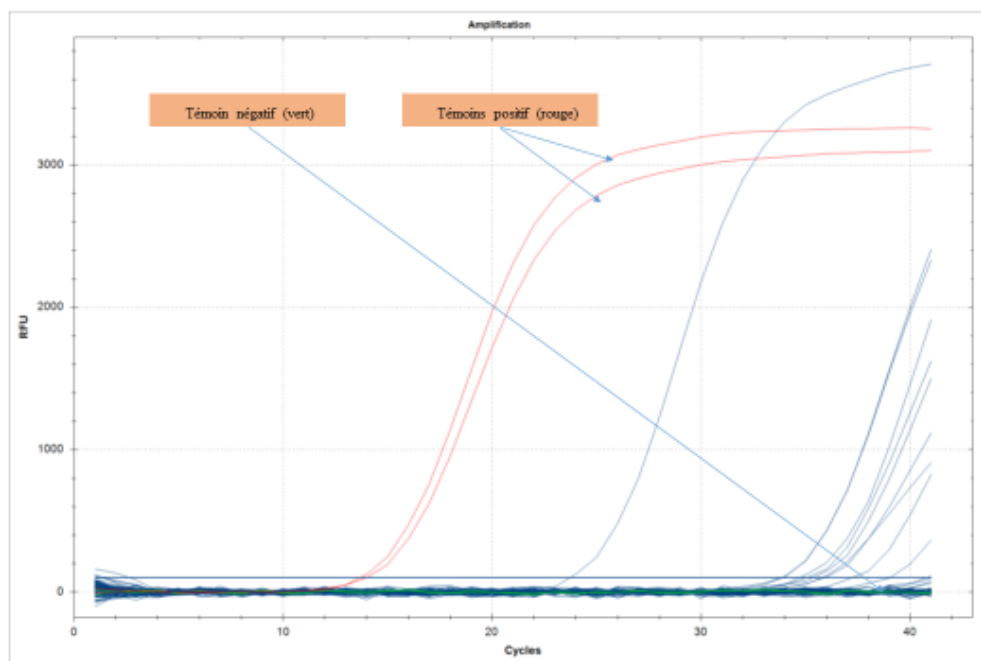


Figure 11: représentation des courbes d'amplification de gène IS1111 de *Coxiella burnetii* par RT-PCR (photo personnelle).

Résultats

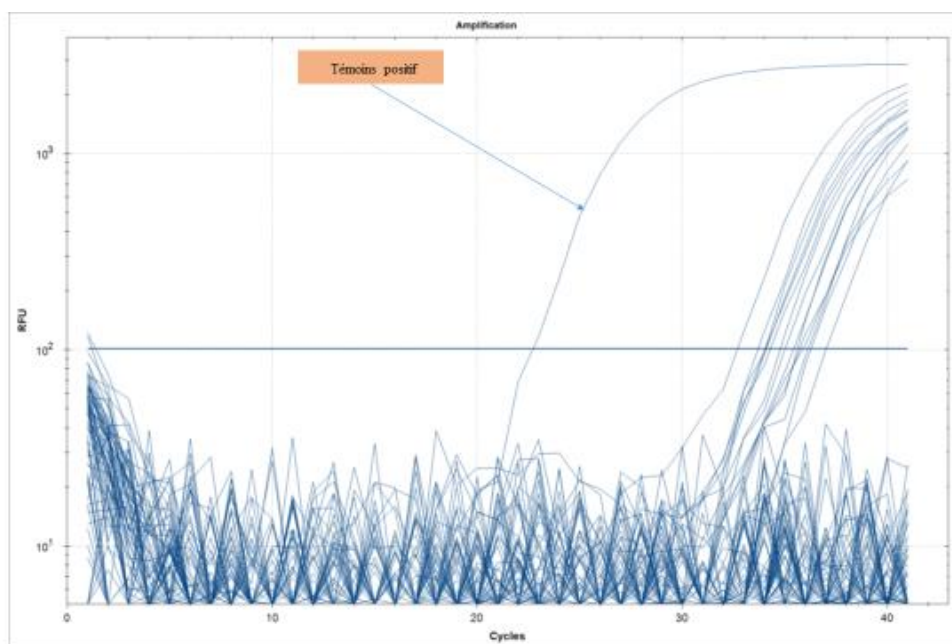


Figure 12: représentation des courbes d'amplification de gène IS30A de *Coxiella burnetii* par RT-PCR (photo personnelle)

Résultats

Tableau 19 : résultats obtenus lors de détection de *C. Burnetii* par ER-PCR avec leurs valeurs cycle seuil

Nu méro	Code et localisations des vaches infectées	cycle seuil		Pourcentage des résultats positifs
		Gène IS1111	GèneIS 30A	
1	Blida	35.04	29.06	09/ 48 (18, 75 %) ont montrés des résultats positifs
2	Blida	_____	27.22	
3	Blida	16.21	18.10	
4	Blida	21.21	22.67	
5	Blida	34.05	33.63	
6	Blida	28.55	_____	
7	Blida	35.88	30.76	
8	Blida	33.79	32.63	
9	Blida	34.67	34.07	
10	Medea	30.76	34.72	05/12 (41,66 %) ont montrés des résultats positifs
11	Medea	35.04	34.05	
12	Medea	35.75	34.24	
13	Medea	33.89	34.04	
14	Medea	27.43	_____	
Bouira		_____	_____	0/ 07
Bordj bouarreridj		_____	_____	0/06

Résultats

IV.1.2. Détection de *Coxiella burnetii* par PCR standard :

Pour ce qui est la recherche de *C. Burnetii* par PCR standard. Les résultats ont varié selon la valeur de cycle seuil d'un côté et selon le système utilisé pour l'amplification d'un autre côté, pour cela les échantillons dont la valeur de cycle seuil inférieur ou égal à 30 ont été souvent positifs, alors que le système COX37 a donné des résultats positifs pour tous les échantillons positifs par RT-PCR après révélation sur gel d'agarose (figure).

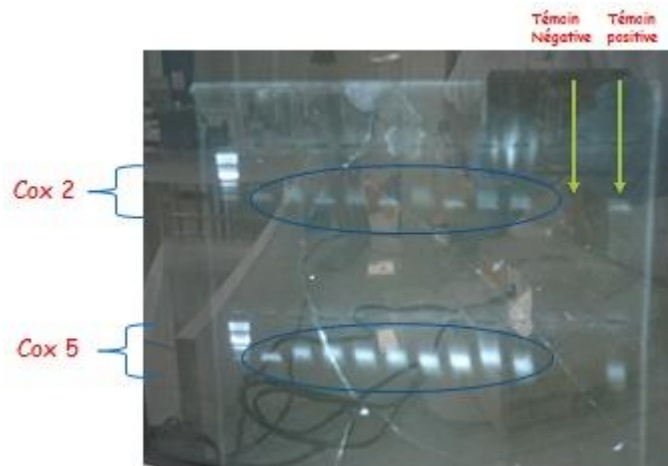


Figure 13: Résultats obtenus lors de l'amplification d'ADN par PCR standard, révélés par migration sur gel d'agarose (photo personnelle).

IV.1.3. Résultats de génotypage par séquençage des zones intergéniques :

Les quatorze échantillons positifs par RT-PCR ont tous fait l'objet pour le séquençage, pour les résultats dont la valeur de cycle seuil inférieur à 29 ont correspondu à 5.1 log₁₀ d'ADN copies/mL. Parmi les sept espaceurs (Cox2, Cox5, Cox18, Cox37, Cox56, Cox57, et Cox61) ciblés pour le séquençage, au moins une seule séquence exploitable a été obtenue pour chaque prélèvement (tableau). Cependant, le MST a été déterminée avec succès pour cinq échantillons uniquement, chacun parmi ces cinq a montré que le génotype trouvé est le MST 20 prélevés à partir des tissus placentaires au niveau des deux wilayas concernées ; Blida (N= 04) et Médéa (N=01), alors que les neuf échantillons restants ont échoué à la détermination de génotype par MST (tableau 18).

L'analyse comparative individuelle des séquences obtenues à partir de Cox37 a montré une similarité des échantillons entre eux de 100 %, et une similarité de 100 % (417/417 pb) avec la souche de *C. burnetii* RSA331 (GenBank accession No. CP000890), pour ce qui est du système COX 56 les séquences obtenues sur les échantillons 39 et 73 ont aussi montré une

Résultats

similarité de 100 % (384/384 pb) avec la souche de *C. burnetii* CB88 (GenBank accession No. AY502783).

En outre les séquences obtenues par le système COX 61 (échantillons 11 et 39) nous ont montré une similarité de 100 % pareillement (608/608 pb) avec la souche de *C. burnetii* RSA439 (GenBank accession No. CP018005). Et finalement une similarité de 100 % aussi a été constatée de séquences obtenues par le séquençage du système COX 57 (598/598 pb) avec la souche *C. burnetii* RSA439 (GenBank accession No. CP018005).

Tableau 20 : les génotypes trouvés par séquençage des zones intergéniques (MST) dans les échantillons positifs.

ID d'échantillons	Espaceurs							Génotype
	COX2	COX5	COX18	COX37	COX56	COX57	COX61	MST
(N= 14)								
10	-	-	-	+	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-	+	-
12	-	-	-	+	-	-	-	-
17	-	-	-	+	-	-	-	-
31	-	-	-	+	-	-	-	-
40	-	-	-	+	+	-	+	-
72	-	-	-	-	+	+	-	-
74	-	-	-	+	-	-	-	-
75	-	-	-	+	-	-	-	-
20, 25, 30, 39 et 73	COX2 .3	COX5 .2	COX18 .6	COX37 .4	COX56 .10	COX57 .6	COX61 .5	20

+ : séquencé ; - : échoué ; 20, 25, 30, 39 et 73 : échantillons dans lesquels le génotypage par MST a été déterminé avec succès ; 3, 2, 6, 4, 10, 6 et 5 : numéros correspondant à chaque espaceur amplifié.

Résultats

IV.2.1. Détection de *Chlamydia Spp* par PCR en temps réel (RT-PCR) :

Pour ce qui est de la détection de *Chlamydia Spp* par RT-PCR dans les 73 échantillons qui ont été collectés dans les quatre wilayas, douze échantillons ont montré un résultat positif soit un, pourcentage de 16.4 % de tous les échantillons.

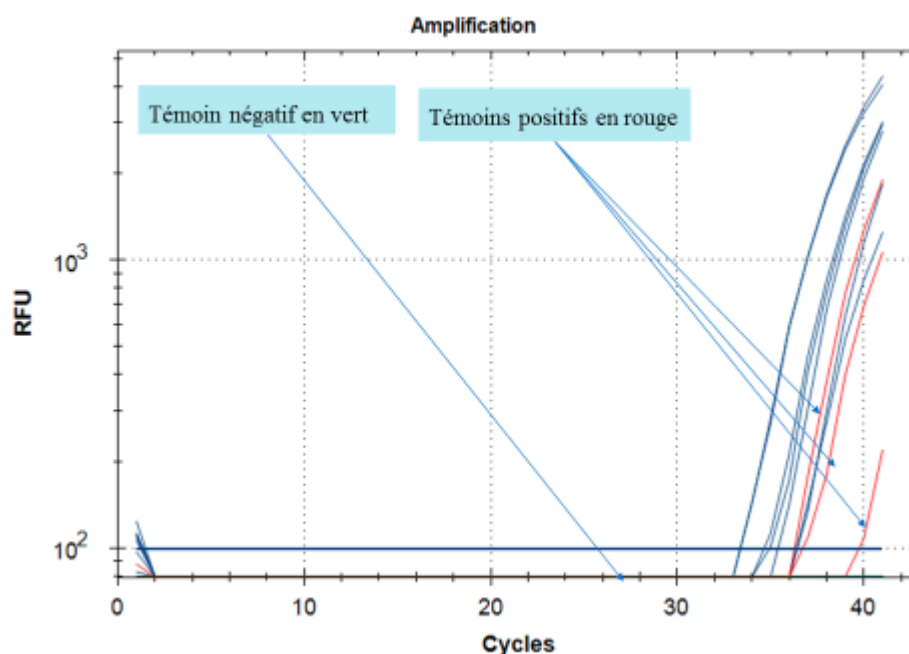


Figure 14: représentation des courbes d'amplification de gène 23S rRNA spécifique pour la famille des *Chlamydiaceae* par RT-PCR (Photo personnelle).

En effet, ces positifs ont aussi été détectés dans les mêmes wilayas concernées par *Coxiella burnetii* et qui sont Blida (N=07) et Médéa (N=05). Tous ces échantillons ont été modérément chargés par la bactérie avec une valeur cycle seuil oscillant entre 33.3 et 36.5.. Alors que tous les échantillons collectés à Bouira et Bordj bouarreridj ont montré des résultats négatifs.

Résultats

Tableau 21 : Résultats obtenus lors de détection de *Chlamydia Spp* par RT-PCR avec leurs valeurs cycle seuil.

Classement	Localisations	cycle seuil
1	Médéa	33.30
2	Blida	33.31
3	Médéa	34.97
4	Blida	36.25
5	Blida	35.33
6	Médéa	35.15
7	Blida	36.38
8	Blida	35.48
9	Blida	34.78
10	Blida	34.95
11	Médéa	36.52
témoin positif 1		36.38
témoin positif		36.89
témoin positif 3		39.87

Résultats

IV.2.2. Résultats obtenus par séquençage des *Chlamydias* Spp

Les douze échantillons positifs par RT-PCR ont été séquencés chacun par 05 gènes différents, cependant toutes tentatives de séquençage pour l'identification de l'espèce responsable des avortements ont échoué à l'exception d'un seul prélèvement et avec un seul gène cible uniquement, prélèvement concerné avait un cycle seuil de 34.95 et avec le gène rRNA03, rRNA04, le résultat de ce séquençage nous a donné une identification jusqu'à l'échelle de l'espèce. L'analyse comparative individuelle des séquences obtenues à partir de gène rRNA03, rRNA04 a montré une similarité de 94 % (102/109 pb) avec la souche de *Chlamydia psittacistrain* GIMC 2005 (GenBank accession No. CP024451).

IV.3. Recherche des leptospires par PCR en temps réel (RT-PCR) :

Pour ce qui est de la détection de *Leptospiraspp* par RT-PCR tous les échantillons nous ont montré des résultats négatifs sans aucune exception figure

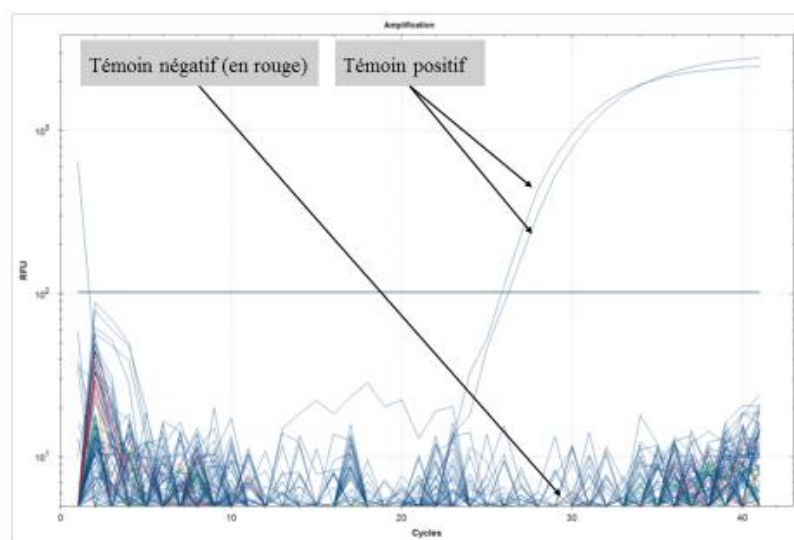


Figure 15: représentation des courbes d'amplification de gène 16 S rRNA ciblé pour la recherche des *Leptospires* par RT-PCR (Photo personnelle).

V. Discussion :

Dans cette étude, nous avons trouvé que RT-PCR ciblant la séquence de *C. burnetii* IS1111 des tissus placentaires était positif dans 19,1 % des vaches avortées.

Les cas positifs ont été détectés dans deux régions ; Blida et Médéa. Tous les échantillons de Bouira et Bordj-Bou-Argeridj ont montré des résultats négatifs. Cependant, le faible nombre (N = 15) d'échantillons collectés dans ces deux régions peut représenter un biais et expliquer ce résultat négatif ce qui n'infirme pas son occurrence dans ces deux wilayas.

De plus, l'échantillonnage était basé uniquement sur des cas d'avortement occasionnels dans la zone d'étude, de sorte que la taille de l'échantillon dépend strictement sur les nouveaux cas d'avortement pendant la période d'étude. De plus, les éleveurs étaient moins susceptibles d'aviser les vétérinaires lorsque leurs vaches viennent de mettre bas sans complications. Cela peut expliquer le nombre limité d'échantillons issus de vaches avec vêlages naturels.

En Algérie, les services vétérinaires se concentrent sur la brucellose comme cause d'avortement, grâce à un programme national pluriannuel de dépistage basé sur le test de Rose-Bengale et de fixation des compléments comme test de confirmation (Kardjadj 2016). Par conséquent, nous avons formulé l'hypothèse que nos vaches échantillonnées étaient indemnes de brucellose. Cependant, d'autres agents infectieux peuvent avoir été négligés. De plus, cela signifie que les autres infections impliquées dans leurs avortements telles que la fièvre Q est totalement négligée, en fait la relation entre l'infection à *C. burnetii* et l'avortement des vaches laitières a été rapporté dans différents pays dans le monde tel que Canada, les États-Unis, l'Égypte, la France, la Suisse, l'Allemagne et l'Italie (Meadows et al. 2016)(Abdel-moein et Hamza 2016)(Reisberg, Selim, et Gaede 2013)(Cabassi et al. 2006). Alors que, les produits d'avortement représentent la principale source de contamination, tant pour l'homme et l'animale.

En Algérie, *C. burnetii* a déjà été rapportée chez les petits ruminants et l'ADN de *C. burnetii* a été détecté dans 57 échantillons (21,3 %) prélevés par écouvillonnage vaginal sur un total de 267 troupeaux d'ovins et de caprins (Khaled et al. 2016). Cette valeur est proche de notre prévalence estimée (19,1 %). Très souvent, les éleveurs élèvent des ovins, des caprins et des bovins dans la même ferme et partagent les mêmes zones de pâturage. Cela peut être la principale raison de la contamination entre ces ruminants.

Discussion

En ce qui concerne les pays voisins de l'Algérie, une séroprévalence similaire de 17 % chez les petits ruminants ayant avorté a été publiée en Tunisie et une séroprévalence de 33 % a été déclarée chez les petits ruminants aussi au Maroc (Vanderburg et al. 2014). Cette similarité serait liée au commerce incontrôlé des animaux à travers les frontières entre les deux pays et le système d'élevage semblable (transhumance).

Des cas humains d'endocardite infectieuse causée par *C. burnetii* ont déjà été détectés en Algérie et Lacheheb et Raoult (Lacheheb et Raoult 2009) qui ont trouvé une séroprévalence de 15,5% (113/729) chez l'homme en Algérie. La séroprévalence est estimée à 18,5 %, avec une large variation de 7,7 % dans les zones urbaines à 35 % dans les zones rurales.

La présence de *C. burnetii* chez les bovins avortés peut être considérée comme une source d'infection humaine. Dans l'étude de Tebbal dans les Aures le taux de *C. Burnetii* a été estimé à (14.19%) (Données non publiées). Une des raisons de cette haute séroprévalence de *C. burnetii* chez l'homme dans différentes zones en Algérie serait le nombre élevé des animaux de bétail (spécialement les bovins et les petits ruminants) (Lacheheb et Raoult 2009). En effet les taux de séroprévalence les plus élevés ont été observés chez les propriétaires des ruminants, les habitants des zones rurales et les travailleurs des abattoirs vu qu'ils sont en contact permanent avec les animaux tels que les bovins (Lacheheb et Raoult 2009).

Dans cette étude, nous avons montré la présence de génotype MST 20 pour *C. burnetii* dans des placentas de vaches laitières ayant avortées, ce qui n'a jamais été rapporté en Algérie jusqu'à ce jour. Nous avons utilisé le génotypage par séquençage des zones intergéniques (MST) pour déterminer les génotypes de *C. burnetii* (Glazunova et al. 2005). Cette méthode est très discriminante et a été utilisée dans 19 études différentes pour détecter *C. burnetii* chez l'homme, les animaux, ou dans les prélèvements de l'environnement à travers le monde (Eldin et al. 2017). Cette méthode peut être directement applicable à différents types d'échantillons sans avoir besoin d'une culture préalable, par rapport aux techniques de séquençage du génome entier. En outre, une base de données mondiale de MST est disponible, permettant une comparaison inter-laboratoire et géographique de la propagation des génotypes. Pour cette raison, cette technique a été considérée comme une "méthode de géotypage". En comparaison avec d'autres méthodes de géotypage, cette technique est moins discriminante que la technique de l'analyse de plusieurs locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeats en français : répétition en tandem polymorphe) qui est une autre méthode principalement utilisée en Europe chez les ruminants (Eldin et al. 2017). Cependant, nous

Discussion

n'avons pas choisi d'utiliser cette méthode car elle manque de reproductibilité inter-laboratoire et l'analyse des éléments répétitifs est relativement instables ce qui peut aboutir à des résultats trop discriminatoires. D'autres méthodes ont été utilisées dans des contextes trop étroits ou localisés, expliquant pourquoi nous ne les avons pas utilisées (RADP, *adaA*, SNP) (Eldin et al. 2017).

En Europe, des études de génotypage ont montré que les ovins et les caprins étaient les principales sources des épidémies humaines (Frangoulidis et al. 2014) et d'autres études ont mis l'hypothèse qu'une différence dans la réponse de cytokine des PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) humaines au génotype associé aux bovins pourrait expliquer ce fait (Ammerdorffer et al. 2017). Cependant, en Pologne, les épidémies humaines semblent être plus fréquemment liées aux bovins et non pas aux autres ruminants (Chmielewski et Tylewska-Wierzbanska 2013). En outre, le génotype MST 20 a été détecté chez des bovins dans plusieurs pays à travers le monde ; Espagne (Astobiza et al. 2012), Hongrie (Sulyok, Kreizinger, et al. 2014), Pays-Bas (Tilburg et al. 2012) et États-Unis (Pearson et al. 2014b)) mais aussi chez l'homme dans des cas d'endocardite (valve cardiaque), des prothèses valvulaires et anévrismes (Glazunova et al. 2005). MST20 a également été isolé à partir de placentas de femmes avortées en France (E. Angelakis et al. 2013). Ces éléments suggèrent que l'excrétion de *C. burnetii* chez les bovins constitue également une source importante de contamination humaine.

Dans notre étude, la viabilité de la bactérie *C. burnetii* n'est pas prouvée, mais la présence d'ADN dans les tissus placentaires des vaches laitières avortées devrait encourager d'autres études sur son implication dans l'avortement des vaches laitières en Algérie. Qui est un enjeu majeur, car l'élevage représente une source de revenus pour une partie importante de la population, avec environ deux millions de têtes bovins, 27,8 millions de têtes d'ovins, 5,1 millions de têtes de caprins et 0,35 millions de têtes de camelins (Food and Agriculture Organization.pdf s. d.).

Nous concluons donc que la collaboration entre le ministère de la santé et de la population et de la réforme hospitalière et la Direction des Services Vétérinaires en Algérie est cruciale pour mieux connaître la prévalence de l'infection à *C. burnetii* chez les bovins et ses conséquences en termes de troubles de la reproduction et de santé humaine.

Pour ce qui est des *Chlamydias Spp*, cette étude avait comme objectifs l'évaluation de l'importance des infections à *ChlamydiaSpp* comme cause de problèmes de fertilité chez les

Discussion

bovins. Bien qu'il soit largement accepté que *Chlamydiaceae* puisse causer une variété de syndromes cliniques chez les bovins. Donc elle nous a montré que sa recherche dans les placentas des vaches ayant avorté aussi par RT-PCR dont le gene cible est le 23 S spécifique pour toute la famille des *Chlamydiaceae* codant pour rRNA a été positive dans 16.4 % de tous les échantillons. Cette prévalence relativement élevée s'explique par l'hypothèse que les infections à *Chlamydiaspp* sont ubiquitaires chez les bovins (Kaltenböck, Schmeer, et Schneider 1997), et une lutte efficace contre cette infection n'est pas adoptée par les services vétérinaires du ministère de l'agriculture, du développement rural et de la pêche en Algérie.

Les wilayas dans lesquelles on a trouvé ces cas positifs sont toujours Blida et Médéa. Cela est pourrait être justifié par le nombre élevé des échantillons collectés dans ces deux wilayas ce qui a augmenté la possibilité de trouver les positifs, ce qui n'infirme pas la circulation des souches de *Chlamydia* au sein des élevages bovins dans ces deux wilayas (Bouira et Bordj Bouarreridj).

Pour cela, on conclut toujours que le dépistage des vaches atteintes par la Chlamydieuse par RT-PCR dans le tissu placentaire est une méthode de choix en raison de sa spécificité et sensibilité étant donné la difficulté d'interprétation des résultats obtenus par sérologie même avec titrage vu que l'augmentation exponentielle de titre d'anticorps circulants dans le sang après une maladie clinique est très rare (Stephens 2003).

Cette séroprévalence trouvée par cette étude est très proche avec celles publiées par plusieurs auteurs et dans différents pays dans le monde telle que celles estimées en Allemagne et qui oscillent entre 13.5 % et 49 % (Reinhold, Sachse, et Kaltenboeck 2011), une prévalence de 8.9 % estimée en Autriche (Petit et al. 2008). Alors que nos résultats sont plus élevés par rapport à ceux publiés au Suède 4.7 % (Godin et al. 2008), et en Suisse ou une prévalence de 5.1 % a été estimée et publiée par (Borel et al. 2004) chez les ovins. Ces prévalences plus faibles que ce qu'on a trouvé dans cette étude pourrait être lié à plusieurs facteurs, tels que l'utilisation des échantillons issus d'avortement uniquement dans notre étude, donc avec problèmes d'infertilités, ce qui a augmenté la possibilité de trouver des cas positifs. Alors que dans leurs études, les animaux ont été choisis d'une manière exhaustive avec ou sans problèmes de fertilité. De plus, nos échantillons utilisés sont à base des placentas dans lesquels les vaches infectées excrètent massivement les *Chlamydias Spp* (Kemmerling et al. 2009) ce qui est considérée comme prélèvement de choix pour leurs détections par PCR mieux que les écouvillonnages vaginaux (utilisés dans leurs études), qui nécessitent un

Discussion

échantillonnage répété chez beaucoup d'animaux vu que l'élimination des *ChlamydiasSpp* est discontinuée ce qui aboutit aux résultats faussement négatifs (Degraives et al. 2003).

Alors que nos résultats sont en divergence avec ceux publiés dans d'autres pays au monde tels ceux publiés au Taiwan où une prévalence de 34.9 % a été rapportée chez des vaches ayant avorté (Wang, Shieh, et Liao 2001). Et aux Etats unis où la prévalence oscille entre 53 % (Kaltenboeck, et al., 1997) et 61 % (Degraives et al. 2003). Cette différence serait liée à la prolongation de la durée de réalisation des prélèvements qui a duré quatre semaines, ce qui a augmenté la probabilité de trouver des cas positifs et l'augmentation de la prévalence par conséquent.

Le séquençage des positifs de *Chlamydia Sppa* échoué à l'exception d'un seul prélèvement et avec un seul gène cible uniquement qui a donné une identification jusqu'à l'échelle de l'espèce, avec une similarité de 94 % (102/109 pb) avec la souche de *Chlamydia psittaci*. Cette espèce a déjà été décrite dans d'être responsable des problèmes d'infertilité chez les ruminants est spécialement le sérotype 1 (Berri et al. 2009). Ce qui soutient nos résultats, par conséquent, les ruminants y compris les bovins sont considérés comme source d'infection pour l'homme vu que cette espèce, a été rapportée dans des cas des pneumonies et des avortements chez les femmes enceintes, du coup M. MAURIN et D. RAOULT recommandent l'utilisation d'un vaccin contenant les deux phases de *C. burnetii* et *Chlamydia Psittaci* protège les bovins et les caprins contre les problèmes d'infertilités (Maurin et Raoult 1999). Finalement *Chlamydia Psittacia* été rapportée dans des cas d'avortement des bovins en Algérie, selon l'étude menée par Dechicha dans une ferme à Blida où cette espèce a été détectée par sérologie, (par test de fixation des compléments) ce qui est identique à notre recherche. Pour cela on peut considérer cette espèce est responsable des avortements des bovins en Algérie

Pour ce qui est des *leptospiraSpp*. Sa recherche par RT-PCR ciblant gène *rrs* (16 S) n'a pas donné des résultats positifs pour tous les échantillons dépistés dans notre étude. Cette négativité n'infirme pas son occurrence et donc l'implication de cette bactérie dans les avortements constatés chez les bovins, vu que le nombre des échantillons n'est pas assez élevé pour confirmer l'indemnité. De plus, les deux courbes des témoins positifs sur la représentation des courbes d'amplification de ce gène ont été observées, donc on ne peut pas incriminer une éventuelle mauvaise manipulation d'être à l'origine de cette négativité, de ce

Discussion

fait on peut déclarer que les cas d'avortement échantillonnés durant notre étude ne sont pas dues à la leptospirose alors on incrimine d'autres agents abortifs.

D'un autre côté Derdour S Y et al ont rapporté une seroprevalence de 3.89 % en Algérie, à Alger (zone géographiquement proche, de celle concernée par notre étude) ce qui infirme l'indemnité de notre cheptel bovin de la leptospirose (Derdour et al. 2017). Cependant, selon cette étude, le risque majeur des avortements des bovins est lié aux infections par bovine viral diarrhoea virus BVDV et *Salmonella Dublin*, et en deuxième position par *Leptospira Hardjo*, paradoxalement dans notre étude cette bactérie n'a été détectée dans les placentas des vaches ayant avortées par RT-PCR, ce qui est en divergence avec leurs étude.

VI. Conclusion

La fièvre Q et la Chlamydiosesont de plus en plus incriminées dans les avortements des ruminants. Cette étude nous a permis non seulement d'apprécier l'importance de la Chlamydiose et de la fièvre Q, mais aussi de savoir les génotypes circulant en Algérie. La fièvre Q était un domaine de recherche peu développé vu que peu de recherches ont été menées sur cette maladie. Ces événements ont attiré l'attention sur cette maladie, que nous espérons sera mieux compris dans les années à venir, car elle reste une maladie étrange qui a justifié son nom Q Fever en anglais.

Cette étude a porté sur l'évaluation des méthodes de diagnostic utilisées pour la détection de l'infection à *C. burnetii*, *Chlamydia Spp* et *Leptospraspp* chez les bovins, Le diagnostic de l'infection doit impliquer l'utilisation de techniques multiples, l'évaluation de la séroprévalence s'avérant très utile pour reconnaître la présence de ces infections dans nos élevages

En outre la détection des excréteurs persistants dans les troupeaux laitiers pourrait être un outil important pour réduire les risques de transmission chez les animaux. Dans cette étude, nous avons trouvé que RT-PCR ciblant la séquence de *C. burnetii* IS1111 des tissus placentaires était positif dans 19,1% des vaches avortées en fait le rapport entre l'infection à *C. burnetii* et les avortements des vaches laitières ont été rapportés dans différents pays du monde.

Pour la première fois en Algérie, cette étude nous a permis d'identifier le MST génotypes circulant au sein de nos élevages bovins laitiers, le MST 20. De plus, l'identification des génotypes MST chez les réservoirs animaux permettra aussi l'investigation des principales sources de l'infection humaine par *C. Burnetii*, vu que le MST 20 a été déjà identifié dans des cas humains tels que l'endocardite (valve cardiaque), des prothèses valvulaires et anévrismes (Glazunova et al. 2005). Et à partir de placentas de femmes avortées en France (E. Angelakis et al. 2013) ces données théorique suggèrent que les bovins laitiers seraient considérés comme un réservoir naturel de *C. Burnetii* ce qui menace la santé humaine par la suite. Pour cela une identification des génotypes MST chez l'homme et chez d'autres des ruminants serait nécessaire pour mieux comprendre l'origine des infections entre les ruminants et pour l'homme

Conclusion

Dans notre étude, la détection de *Chlamydia Spp* par RT-PCR a montré que 16.4 % de tous les échantillons ont donné un résultat positif, une séroprévalence relativement élevée fait de la Chlamydiose bovine une maladie sous-estimée en Algérie.

Les avortements bovins sont à l'origine de nombreuses pertes économiques pour les éleveurs, mais présentent aussi des risques zoonotiques, c'est pourquoi il semble important d'en trouver l'étiologie exacte. Afin d'établir un traitement efficace de l'avortement, et de diminuer leurs incidences et son potentiel zoonotique par la suite. De plus, il semble intéressant de se pencher sur les avortements bovins, dont l'étiologie n'est que trop rarement recherchée.

VII. Recommandations

1. Isolement et protection des personnes à risque contre les maladies abortives des bovins vu qu'elles sont très contagieuses et parfois transmissibles à l'homme. Des mesures de protection sont très fortement recommandées :

2. Isoler les femelles avortées : dans un box isolé, qui peut être nettoyé et désinfecté.

3. Rechercher les causes d'avortement spécialement dans le placenta et l'avorton, car sont considérés comme prélèvements pour le diagnostic direct des maladies abortives.

4. Se protéger soi-même et son élevage : porter des gants, se laver soigneusement les mains, mettre en place un pédiluve, etc.

5. Etablir un diagnostic et spécialement pour les maladies potentiellement zoonotiques (Fièvre Q, Chlamydiose, brucellose..... ext).

6. Prendre en charge ces maladies par un conseil général.

7. Les analyses de seconde intention sont à déterminer en fonction du contexte épidémiologique par la détermination de différentes souches (sérotypes, génotypes, phagotypes.....ext) impliquées dans les avortements vu qu'une lutte efficace dépend fortement par l'identification des souches circulantes au sein de la population.

Références

Références

Abdel-moein, Khaled A, et Dalia A Hamza. 2016. « The burden of *Coxiella burnetii* among aborted dairy animals in Egypt and its public health implications ». *Acta Tropica*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.011>.

Ammerdorffer, Anne et al. 2017. « *Coxiella burnetii* isolates originating from infected cattle induce a more pronounced proinflammatory cytokine response compared to isolates from infected goats and sheep. » *Pathogens and disease* 75(4): 28387835.

Anastácio, S. et al. 2013. « Serological evidence of exposure to *Coxiella burnetii* in sheep and goats in central Portugal ». *Veterinary Microbiology* 167(3-4): 500-505.

Angelakis, E. et al. 2013. « Q fever and pregnancy: Disease, prevention, and strain specificity ». *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 32(3): 361-68.

Angelakis, Emmanouil et al. 2014. « *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa ». *International Journal of Infectious Diseases* 28: e107-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.029>.

Angelakis, Emmanouil, et Didier Raoult. 2010. « Q fever ». *Veterinary Microbiology* 140(3-4): 297-309.

Astobiza, Ianire et al. 2012. « Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain ». *BMC Veterinary Research* 8: 1.

Bachmann, Nathan L., Adam Polkinghorne, et Peter Timms. 2014. « Chlamydia genomics: Providing novel insights into chlamydial biology ». *Trends in Microbiology* 22(8): 464-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.013>.

Berri, Mustapha, Abdessalem Rekiki, Karim Sidi Boumedine, et Annie Rodolakis. 2009. « Simultaneous differential detection of *Chlamydomydia abortus*, *Chlamydomydia pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. » *BMC microbiology* 9: 130.

Boarbi, Samira, David Fretin, et Marcella Mori. 2016. « *Coxiella burnetii*, agent de

Références

la fièvre Q ». *NRC Research Press* 122: 102-22.

Boden, Katharina, Sabine Brasche, Eberhard Straube, et Wolfgang Bischof. 2014. « Specific risk factors for contracting Q fever: Lessons from the outbreak Jena ». *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217(1): 110-15.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.04.004>.

Borel, N. et al. 2004. « Seroprevalences for ovine enzootic abortion in Switzerland ». *Preventive Veterinary Medicine* 65(3-4): 205-16.

Borel, N et al. 2006. « Chlamydia-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. » *Veterinary pathology* 43(5): 702-8.
<http://vet.sagepub.com/content/43/5/702.long>.

Bouchon, Didier, Nicolas Cerveau, et Richard Cordaux. 2011. « Evolutionary Biology – Concepts, Biodiversity, Macroevolution and Genome Evolution ». : 291-312.
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-20763-1>.

Van den Brom, R. et al. 2015. « Coxiella burnetii infections in sheep or goats: An opinionated review ». *Veterinary Microbiology* 181(1-2): 119-29.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.011>.

Cabassi, Clotilde S. et al. 2006. « Association between Coxiella burnetii seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy ». *New Microbiologica* 29(3): 211-14.

Chmielewski, Tomasz, et Stanisława Tylewska-Wierzbanska. 2013. « Q fever outbreaks in Poland during 2005-2011. » *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 19: 1073-79.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3852849&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

D'amato, F. et al. 2014. « Draft genome sequence of Coxiella burnetii Dog Utad, a strain isolated from a dog-related outbreak of Q fever ». *New Microbes and New Infections* 2(4): 136-37.

D'Amato, Felicetta et al. 2015. « Loss of TSS1 in hypervirulent Coxiella burnetii 175, the causative agent of Q fever in French Guiana ». *Comparative Immunology*,

Références

Microbiology and Infectious Diseases 41: 35-41.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2015.04.003>.

Degraves, Fred J et al. 2003. « High-Sensitivity Real-Time PCR Reveals High Prevalence of Vaginal Infection in Cattle ». 41(4): 1726-29.

Derdour, Salima Yamina et al. 2017. « Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria ». *Journal of Veterinary Research (Poland)* 61(3): 337-43.

Di Domenico, Marco et al. 2014. « Coxiella burnetii in Central Italy: Novel Genotypes Are Circulating in Cattle and Goats ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 14(10): 710-15. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2014.1587>.

Ehricht, Ralf et al. 2006. « Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies ». *Molecular and Cellular Probes* 20(1): 60-63.

Eldin, Carole et al. 2017. « From Q fever to Coxiella burnetii infection: A paradigm change ». *Clinical Microbiology Reviews* 30(1): 115-90.

Everett, K. D. E., R. M. Bush, et A. A. Andersen. 1999. « Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 49(2): 415-40. <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-2-415>.

Everett, Karin D.E., Linda J. Hornung, et Arthur A. Andersen. 1999. « Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: Three PCR tests ». *Journal of Clinical Microbiology* 37(3): 575-80.

« Food and Agriculture Organization.pdf ».

Fournier, Pierre Edouard, Thomas J. Marrie, et Didier Raoult. 1998. « Diagnosis of Q fever ». *Journal of Clinical Microbiology* 36(7): 1823-34.

Frangoulidis, Dimitrios et al. 2014. « Molecular analysis of Coxiella burnetii in Germany reveals evolution of unique clonal clusters ». *International Journal of Medical*

Références

Microbiology 304(7): 868-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.06.011>.

Frankel, Diane, Hervé Richet, Aurélie Renvoisé, et Didier Raoult. 2011. « Q fever in France, 1985-2009 ». *Emerging Infectious Diseases* 17(3): 350-56.

Fukushi, Hideto, et Yoshitsugu Ochiai. 2016. « Phylogenetic Analysis of the Genus Chlamydia Based on 16s rRNA Gene Sequences ». : 425-31.

Glazunova, Olga et al. 2005. « Coxiella burnetii genotyping ». *Emerging Infectious Diseases* 11(8): 1211-17.

Godin, Ann Charlotte et al. 2008. « Investigation of Chlamydophila spp. in dairy cows with reproductive disorders ». *Acta Veterinaria Scandinavica* 50(1): 2-7.

Halsby, Kate et al. 2017. « The Epidemiology of Q Fever in England and Wales 2000–2015 ». *Veterinary Sciences* 4(2): 28. <http://www.mdpi.com/2306-7381/4/2/28>.

Hansen, Mette S. et al. 2011. « Coxiella burnetii associated placental lesions and infection level in parturient cows ». *Veterinary Journal* 190(2): e135-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.12.021>.

Herring, A. J. 1993. « Typing Chlamydia psittaci-A review of methods and recent findings ». *British Veterinary Journal* 149(5): 455-75.

Hornstra, Heidie M. et al. 2011. « Rapid typing of Coxiella burnetii ». *PLoS ONE* 6(11).

Huang, R et al. 1997. « Molecular evolution of the ». 9(6): 561-65.

Hunt, Meredith L, Carmel G Ruffolo, et Kumar Rajakumar. 1998. « Physical and Genetic Map of the ». *Society* 180(22): 6054-58.

Jee, Junbae, Fred J Degraives, Teayoun Kim, et Bernhard Kaltenboeck. 2004. « High Prevalence of Natural Chlamydophila Species Infection in Calves High Prevalence of Natural Chlamydophila Species Infection in Calves ». *Journal of Clinical Microbiology* 42(12): 5664-72.

Johnson, Joseph E, et Paul J Kadull. 1966. « Laboratory Acquired Q Fever - A report of fifty cases. » *American Journal of Medicine* 41(September): 391-403. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TDC-4BX2CJH->

Références

91/2/9f5f1c8c463de03f7801ebce13468717.

Kaltenböck, Bernhard, Norbert Schmeer, et Renate Schneider. 1997. « Evidence for numerous omp1 alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel chlamydial species obtained by PCR ». *Journal of Clinical Microbiology* 35(7): 1835-41.

Kaltenboeck, Bernhard, D A N Heard, et Norbert Schmeer. 1997. « Use of Synthetic Antigens Improves Detection by Enzyme- Linked Immunosorbent Assay of Antibodies against Abortigenic ». *Microbiology* 35(9): 2293-98.

Kardjadj, M. 2016. « The Epidemiology of Human and Animal Brucellosis in ». *Journal of Bacteriology and Mycology* 3(2): 1-6.

Kemmerling, K., U. Müller, M. Mielenz, et H. Sauerwein. 2009. « *Chlamydophila* species in dairy farms: Polymerase chain reaction prevalence, disease association, and risk factors identified in a cross-sectional study in western Germany ». *Journal of Dairy Science* 92(9): 4347-54. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209707581>.

Kersh, Gilbert J. et al. 2013. « Presence and Persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak ». *Applied and Environmental Microbiology* 79(5): 1697-1703.

Khaled, H. et al. 2016. « Serological and molecular evidence of Q fever among small ruminant flocks in Algeria ». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 47: 19-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.05.002>.

Kumsa, Bersissa, Cristina Socolovschi, Lionel Almeras, et al. 2015. « Occurrence and genotyping of *Coxiella burnetii* in ixodid ticks in oromia, Ethiopia ». *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93(5): 1074-81.

Kumsa, Bersissa, Cristina Socolovschi, Didier Raoult, et Philippe Parola. 2015. « Spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks in oromia, ethiopia ». *Ticks and Tick-borne Diseases* 6(1): 8-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.08.001>.

Lacheheb, A., et D. Raoult. 2009. « Seroprevalence of Q-fever in Algeria ». *Clinical Microbiology and Infection* 15(SUPPL. 2): 167-68. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02211.x>.

Lang, G H. 1989. « Q fever: an emerging public health concern in Canada ». *Can J*

Références

Vet Res 53(2): 1-6.

Letaief, Amel Omezzine et al. 1995. « Seroepidemiological survey of rickettsial infections among blood donors in central Tunisia ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89(3): 266-68.

Longbottom, D., et L. J. Coulter. 2003. « Animal chlamydioses and zoonotic implications ». *Journal of Comparative Pathology* 128(4): 217-44.

Lorenz, Helga, Cornelia Jäger, et Hermann Willems. 1998. « PCR Detection of *Coxiella burnetii* from Different Clinical Specimens , Especially Bovine Milk , on the Basis of DNA Preparation with a Silica Matrix PCR Detection of *Coxiella burnetii* from Different Clinical Specimens , Especially Bovine Milk , on the Bas ». *Applied and environmental microbiology* 64(11): 4234.

<http://aem.asm.org/content/64/11/4234.full.pdf>.

Lsi, Leeds. 1990. « Department of Infectious Diseases , Seacroft Hospital , York Road », *Journal of Infection* 6: 251-59.

Matr, R. 2015. « Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Scienze veterinarie e Sanità pubblica PhD COURSE OF VETERINARY HYGIENE AND ANIMAL PATHOLOGY XXVIII cycle *Coxiella burnetii* infection in dairy cows and goats : assessment of diagnostic methods , and evaluatio ».

Maurin, M., et D. Raoult. 1999. « Q fever ». *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 518-53.

McCaul, T. F., et J. C. Williams. 1981. « Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: Structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations ». *Journal of Bacteriology* 147(3): 1063-76.

Mcquiston, Jennifer H, et James E Childs. 2002. « JENNIFER H. MCQUISTON and JAMES E. CHILDS ». 2(3).

Meadows, Shannon et al. 2016. « *Coxiella burnetii* (Q Fever) Seropositivity and Associated Risk Factors in Sheep and Goat Farm Workers in Ontario, Canada ». *Vector Borne & Zoonotic Diseases* 16(10): 643-49.

Mediannikov, Oleg et al. 2010. « *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural

Références

Senegal ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(4): 1-8.

Mohamad, Khalil Yousef, et M Pospischil Andreas. 2009. « Chlamydophila pecorum : Recherche et identification des marqueurs épidémiologiques ».

« Multi Spacers Typing Coxiella Database. [http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/groups.html] ». : 48.

Nguyen, Sa Van, et Katsuya Hirai. 1999. « Differentiation of Coxiella burnetii isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene ». 180: 249-54.

Niemczuk, K. 2005. « Prevalence of antibodies against Chlamydophila psittaci and Chlamydophila abortus in cattle in Poland. A preliminary report. » *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 49(3): 293-97.

Omsland, Anders et al. 2009. « Host cell-free growth of the Q fever bacterium Coxiella burnetii. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(11): 4430-34.
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19246385&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1073/pnas.0812074106>.

Ozbek, A et al. 2008. « [Can Chlamydia trachomatis human biovars cause abortion in cattle? An immunohistochemical study on a new host-pathogen relationship] ». *Mikrobiyol.Bul.* 42(4): 599-605.

Pearson, Talima et al. 2014a. « High prevalence and two dominant host-specific genotypes of Coxiella burnetii in U.S. milk ». *BMC Microbiology* 14(1): 41.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-14-41>.

Talima Pearson^{1*}, Heidie M Hornstra¹, Remy Hilsabeck¹, Lauren T Gates¹, Sonora M Olivas¹, Dawn M Birdsell¹, Carina M Hall¹, Sabrina German¹, James M Cook¹, Meagan L Seymour¹, Rachael A Priestley², Ashley V Kondas², Christine L Clark Friedman¹, Erin P Price^{1,4}, James M Schupp³, Cindy M Liu^{1,3}, Lance B Price³, Robert F Massung², Gilbert J Kersh² and Paul Keim¹. 2014b. « High prevalence and two dominant host-specific genotypes of Coxiella burnetii in U.S. milk ». *BMC Microbiology* 14(1): 41. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-14-41>.

Références

- Petit, Tom, Joachim Spargser, Jörg Aurich, et Renate Rosengarten. 2008. « Prevalence of Chlamydiaceae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle ». *Veterinary Microbiology* 127(3-4): 325-33.
- Pospischil, A. et al. 2002. « Abortion in woman caused by caprine Chlamydophila abortus (Chlamydia psittaci serovar 1) ». *Swiss Medical Weekly* 132(5-6): 64-66.
- Reinhold, Petra, Konrad Sachse, et Bernhard Kaltenboeck. 2011. « Chlamydiaceae in cattle: Commensals, trigger organisms, or pathogens? » *Veterinary Journal* 189(3): 257-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.003>.
- Reisberg, Kerstin, Abdelfattah M. Selim, et Wolfgang Gaede. 2013. « Simultaneous detection of Chlamydia spp., Coxiella burnetii, and Neospora caninum in abortion material of ruminants by multiplex real-time polymerase chain reaction ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25(5): 614-19.
- Roest, H I J et al. 2011. « The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. » *Epidemiology and infection* 139(1): 1-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920383>http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268810002268.
- Sachse, Konrad et al. 2009. « Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections ». *Veterinary Microbiology* 135(1-2): 2-21.
- Santos, Ana Sofia et al. 2012. « Genotypic diversity of clinical Coxiella burnetii isolates from Portugal based on MST and MLVA typing ». *International Journal of Medical Microbiology* 302(6): 253-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.08.003>.
- Serbezov, V. et al. 1999. « Q fever in Bulgaria and Slovakia ». *Emerging Infectious Diseases* 5(3): 388-94.
- Siguié, Patricia, Jonathan Filée, et Michael Chandler. 2006. « Insertion sequences in prokaryotic genomes ». *Current Opinion in Microbiology* 9(5): 526-31.
- Smythe, Lee D et al. 2002. « A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp ». *BMC Infectious Diseases* 2(1): 13. <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-2-13>.
- Splino, Miroslav, Jiri Beran, et Roman Chlibek. 2003. « Q Fever Outbreak during

Références

the Czech Army Deployment in Bosnia. » *Military medicine* 168(10): 840-42.

Stephens, Richard S. 2003. « The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis ». *Trends in Microbiology* 11(1): 44-51.

Sulyok, Kinga M., Sándor Hornok, et al. 2014a. « Identification of novel *Coxiella burnetii* genotypes from Ethiopian ticks ». *PLoS ONE* 9(11): 1-9.

Kinga M. Sulyok¹, Sándor Hornok, Getachew Abichu², Károly Erdei³, Miklós Gyuranecz¹. 2014b. « Identification of novel *Coxiella burnetii* genotypes from Ethiopian ticks ». *PLoS ONE* 9(11): 1-10.

Sulyok, Kinga M, Zsuzsa Kreizinger, et al. 2014. « Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes. » *BMC veterinary research* 10: 107.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4016735&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Thejls, Henning et al. 1994. « Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology. » *Genitourinary medicine* 70(5): 300-303.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1195269&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Tilburg, Jeroen J H C et al. 2012. « Epidemic genotype of *Coxiella burnetii* among goats, sheep, and humans in the Netherlands ». *Emerging Infectious Diseases* 18(5): 887-89.

Tissot Dupont, H et al. 1992. « Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. » *The American journal of medicine* 93(4): 427-34.

Vanderburg, Sky et al. 2014. « Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: A OneHealth Systematic Review ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(4).

Vanrompay, D., R. Ducatelle, et F. Haesebrouck. 1995. « *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis ». *Veterinary Microbiology* 45(2-3): 93-119.

Références

- Veterinaire, Doctorat et al. 2009. « Pour le par ».
- Noémie, Camille, Elodie ABADIE. 2010. « Année 2010 SITE INTERNET D ' AIDE AU DIAGNOSTIC DES AVORTEMENTS BOVINS ».
- Wang, F I, H Shieh, et Y K Liao. 2001. « Prevalence of Chlamydia abortus infection in domesticated ruminants in Taiwan. » *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 63(11): 1215-20.
- Watanabe, Akira, et Hiroshi Takahashi. 2008. « Diagnosis and treatment of Q fever: Attempts to clarify current problems in Japan ». *Journal of Infection and Chemotherapy* 14(1): 1-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-007-0566-Z>.
- Wattiau, Pierre et al. 2008. « Occurrence and genetic diversity of Bacillus anthracis strains isolated in an active wool-cleaning factory ». *Applied and Environmental Microbiology* 74(13): 4005-11.
- Yoshida, H., Y. Kishi, S. Shiga, et T. Hagiwara. 1998. « Differentiation of Chlamydia species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis ». *Microbiol.Immunol.* 42(5): 411-14. pm:9654375.
- Zhang, G Q et al. 1998. « Clinical Evaluation of a New PCR Assay for Detection of Coxiella burnetii in Human Serum Samples ». 36(1): 77-80.

Références