

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la
Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire « RABIE
BOUCHAMA »

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة "ربيع بوشامة"



THESE

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

Thème :

Fièvre Q

Séroprévalence et caractérisation moléculaire de *Coxiella burnetii* dans le Nord-ouest de l'Algérie

Présenté par M. **KARIM Abdelkadir**

Les membres du jury :

Mr : BAROUDI Djamel .	M.C.A.	Président	ENSV-Alger
Mr : KHELEF Djamel.	Professeur.	Directeur de thèse	ENSV-Alger
M ^{me} : AIT-OU DHIA K.	Professeur.	Co-directrice	ENSV-Alger
Mr : OUCHENE Nassim.	M.C.A.	Examineur	U. Saad Dahleb, Blida
Mr : BOUZID Riad.	M.C.A.	Examineur	U. Chadli Bendjedid, El Taref

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience pour mener à bien ce modeste travail.

*A monsieur **KHELEF Djamel**, professeur à l'ENSV d'Alger, qui m'a encadré tout au long de ce travail, en lui exprimant mes profondes reconnaissances et mes vifs remerciements pour son encadrement, son suivi, sa disponibilité, ses conseils judicieux, ses critiques constructives et ses encouragements qu'il m'a prodigué avec gentillesse, tout au long de la réalisation de ce travail, je vous témoigne le plus profond de mes plaisirs de travailler avec vous.*

*À ma Co-promotrice, **M^{me} AIT-LOUDHIA Khatima**, pour son soutien moral, ses encouragements et ses précieux conseils.*

*Nous remercions également le président de jury monsieur **BAROUDI Djamel** et les membres de jury monsieur **OUCHENE Nassim** et monsieur **BOUZID Riad** pour nous avoir honorés de leur présence, et d'avoir consacré leur temps à la lecture de notre mémoire et au jugement de notre travail.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur **José Antonio Oteo Revuelta** pour m'avoir accepté et accueilli chaleureusement au sein dans leur Centre de recherche biomédicale de La Rioja (CIBIR) à l'Espagne. Également un grand merci à ENSV pour les allocations de stage.*

Nous remercions les éleveurs et les vétérinaires, sans qui cette étude n'aurait pu avoir lieu, merci aussi pour leur accueil et leur amabilité.

Enfin nous remercions tous ceux qui nous ont encouragé tout au long de notre parcours et ceux qui ont contribué à notre formation mais que nous n'avons pas cité.

Dédicace :

*L'art de la recherche, de la réussite, pour qu'il puisse donner ses fruits
doit être cultivé pour ses fleurs.*

Ainsi et seulement,

*Au nom de Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce du
quel j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A toute ma famille frères et sœurs, particulièrement à mes chers parents
qui n'ont jamais arrêté de m'encourager,*

A ma femme et mes chers enfants Touka et Abdeljalil.

A mes amis ; Rachid, Yassine, M'nouer

A toutes les personnes qui m'ont soutenu durant tout mon cursus,

*A mon promoteur KHELEF Djamel qui a été régulier dans ses
orientations.*

A toute la communauté scientifique ainsi qu'aux gens reconnaissants.

*A tous ceux qui sont animés par l'amour du savoir et de la recherche et
dont le but essentiel est d'aider l'humanité.*

A tous ceux que je ne saurais citer, mais que je porte dans mon cœur.

RESUME

La fièvre Q est une infection zoonotique, elle affecte essentiellement les ruminants et engendre des pertes économiques et préjudices sanitaire graves liée aux avortements. Cette étude est subdivisée en deux parties, la première vise à estimer la séroprévalence de la fièvre Q chez les ovins. Deuxièmement, réaliser une caractérisation moléculaire de *C. burnetii* chez des tiques collectées chez les cheptels ovins et bovins dans deux wilayas de Sidi Belabbes et Saida nord-ouest de l'Algérie. L'enquête sérologique a été réalisée entre juillet et décembre 2013 dans la wilaya de Sidi Belabbes sur 39 troupeaux présentant des troubles abortifs. Dans laquelle, 180 sérums ont été prélevés à partir des brebis ayant avortées. Le kit, Fièvre Q indirecte kit ELISA (ID Screen) a été utilisé pour détecter les anticorps chez les brebis. Dans l'investigation moléculaire, les espèces des tiques ont été identifiées morphologiquement puis par une PCR classique. L'identification de l'espèce *C. burnetii* a été effectuée par qPCR et par séquençage d'ADN extrait. Les résultats de l'étude sérologique ont montré que 27,8% (50/180) des brebis étaient séro-positives à la fièvre Q. Aussi, 28 troupeaux a révélé au moins un animal séropositif pour la fièvre Q donnant une séroprévalence troupeau de 71,8%. Les troupeaux à effectifs importants ont été plus infectés que les troupeaux petits et moyens taille. Concernant la caractérisation moléculaire, sur un total de 149 tiques, *Coxiella burnetii* a été amplifié dans 7 tiques d'espèce *Rhipicephalus bursa* et 9 tiques d'espèce *Hyalomma excavatum*. Parallèlement, d'autres bactéries comme les *Rickettsia* spp ont été identifiées dans 36 tiques, dont 8 souches appartiennent à l'espèce *R. aeschlimannii* détecté dans les tiques d'espèce *Hyalomma* (3 *H. marginatum* et 5 *H. excavatum*). De plus, 28 souches de *Candidatus R. barbariae* a été détecté dans les tiques d'espèce *Hyalomma excavatum* et *R. bursa*. Ces résultats montrent que l'infection par la fièvre Q due au *C. burnetii* existe dans la région d'étude et démontrent aussi pour la première fois la présence de « *Candidatus R. barbariae* » associé aux tiques dans le nord de l'Afrique.

Mots-clés : Fièvre Q, *Coxiella burnetii*, ovins, bovins, tiques, *Rickettsia* spp, qPCR.

ABSTRACT

Q fever is a zoonotic infection, it affects mainly the ruminants and have economic losses and serious health damage related to abortions. This study is subdivided into two parts, the first aimed to estimate the seroprevalence of Q fever in sheep. Secondly, perform a molecular characterization of *C. burnetii* in ticks collected from sheep and cattle in two wilayas of Sidi Belabbes and Saida located in north-west of Algeria. The serological survey was conducted between July and December 2013 in the wilaya of Sidi Belabbes on 39 herds with abortive disorders. In which, 180 sera were taken from the ewes having abortion. The kit, indirect Q fever ELISA kit (ID Screen) was used to detect the antibodies in ewes. In the molecular investigation, tick species were identified morphologically and then by classical PCR. The identification of *C. burnetii* species was performed by qPCR and by sequencing method. The results of the serological study showed that 27.8% (50/180) of the ewes were seropositive to Q fever. Moreover, 28 herds revealed at least one seropositive animal for Q fever giving seroprevalence flock of 71.8%. Large herds were more infected than small and medium sized herds. Regarding the molecular characterization, from a total of 149 ticks, *Coxiella burnetii* was amplified in 7 ticks of *Rhipicephalus bursa* species and 9 ticks of *Hyalomma excavatum*.species. In parallel, other bacteria such as *Rickettsia spp* were identified in 36 ticks, in which 8 strains belonged to the species *R. aeschlimannii* detected in ticks of *Hyalomma* species (3 *H. marginatum* and 5 *H. excavatum*). In addition, 28 strains of *Candidatus R. barbariae* were detected in ticks of the species *Hyalomma excavatum* and *R. bursa*. These results show that Q fever infection causing by *C. burnetii* exists in the study area and demonstrates also for the first time the presence of "*Candidatus R. barbariae*" in tick in northern Africa.

Key-words: Q fever, *Coxiella burnetii*, sheep, catlles, ticks, *Rickettsia spp*, qPCR.

الملخص

حمى الإستفهام هي عدوى حيوانية المنشأ، تؤثر بشكل رئيسي على الحيوانات المجترة وتتسبب في خسائر اقتصادية وأضرار صحية جسيمة تتعلق بالإجهاض. . تنقسم هذه الدراسة إلى قسمين ، الأول يهدف إلى تقدير الانتشار المصلي لحمى الاستفهام في الأغنام و عوامل الخطر المرتبطة. ثانياً، إجراء دراسة جزيئية للحمض النووي لبكتيريا كوكسيلا بيرنتي المستخرجة من القراد التي تم جمعها من الأغنام والبقر في كل من ولايتي سيدي بلعباس وسعيدة في الشمال الغربي من الجزائر. تم إجراء المسح المصلي في الفترة ما بين تموز (يوليو) وكانون الأول (ديسمبر) 2013 في ولاية سيدي بلعباس على 39 قطيعاً مصاباً باضطرابات الإجهاض. وفيه ، تم أخذ 180 مصل من النعاج بعد الإجهاض حيث تم استخدام اختبار الابليزا غير المباشر لتحديد الاغنام المصابة بمرض حمى الاستفهام بينما في الدراسة الجزيئية، تم تحديد أنواع القراد شكلياً ومن ثم عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل الكلاسيكي كما تم البحث أيضاً عن بكتيريا كوكسيلا بيرنتي وميكروبات أخرى بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل الحقيقي. أظهرت نتائج الدراسة المصلية أن 27.8 % (180/50) من النعاج كانت إيجابية المصل لحمى الإستفهام وأن 28 قطيعاً يحتوي على الأقل على نعجة واحدة إيجابية لحمى الإستفهام، كما بينت الدراسة أن القطعان ذات العدد الكبير أكثر إصابة من القطعان الصغيرة ومتوسطة العدد. فيما يتعلق بالدراسة الجزيئية للعامل المسبب لحمى الإستفهام، تم جمع 149 قرادة من الأغنام والبقر في ولايتين في شمال غرب الجزائر، على 149 قرادة، تم التأكيد على وجود الحمض النووي لبكتيريا الكوكسيلا بيرنتي في 7 قرادات من نوع ريببسيفالييس بيرسا و9 من نوع هيالوما إكسكافاتم كما تم الحصول أيضاً الحمض النووي ل36 نوع نت البكتيريا ريكتيسيا منها 8 من نوع ريكتيسيا إسكليمانى و 26 من نوع كونديداتيس ريكتيسيا بريري في القراد من نوع ريببسيفالييس بيرسا و هيالوما إكسكافاتم.

الكلمات المفتاحية: حمى الإستفهام، كوكسيلا بيرنتي، الغنم، البقر، القراد، ريكتيسيا، تفاعل البلمرة المتسلسل.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

I. INTRODUCTION : _____ **1**

Première partie : REVUE DE LITTERATURE

I. HISTORIQUE : _____ **3**

II. ETUDE DE LA BACTERIE : _____ **4**

II.1 Taxonomie : _____ **4**

II.2 Caractéristiques morphologiques : _____ **4**

II.3 Organisation génomique : _____ **5**

II.4 Cycle de développement : _____ **6**

II.4.1 Les variantes de petite taille : (En anglais « small cell variant SCV »). _____ **6**

II.4.2 Les variantes de grande taille : (en anglais « large cell variant LCV ») _____ **6**

II.4.3 Variation de phase antigénique : _____ **7**

II.5 Facteurs de virulence : _____ **8**

II.6 Ethio-pathogénie : _____ **8**

III. PRESENTATION CLINIQUE : _____ **11**

III.1.1 Chez les petits ruminants : _____ **11**

III.1.2 Chez les bovins : _____ **13**

III.1.3 Chez l'homme : _____ **14**

III.2 Lésion : _____ **14**

IV. EPIDEMIOLOGIE : _____ **15**

IV.1 Réservoir : _____ **16**

IV.2 Les voies de transmissions : _____ **16**

IV.2.1 Voies et circonstances de contamination entre animaux : _____ **17**

IV.2.2 Voies de contamination de l'homme : _____ **17**

V. DIAGNOSTIC : _____ **19**

V.1	Diagnostic indirect : _____	20
V.1.1	Réaction de fixation du complément (CFT) : _____	20
V.1.2	ELISA : _____	21
V.1.3	I.F.I. (Immunofluorescence Indirecte) : _____	22
V.1.4	Test cutané : _____	22
V.1.5	Les inconvénients des méthodes indirectes de diagnostic : _____	23
V.2	Diagnostic direct : _____	23
V.2.1	Isolement de l'agent : _____	24
V.2.2	Techniques de coloration : _____	24
V.2.3	Méthodes de génotypage : _____	25
V.2.4	Méthodes de détection spécifiques : _____	25
VI.	TRAITEMENT : _____	26
VII.	Méthodes de contrôle et vaccination : _____	27
VII.1	Méthodes de contrôle : _____	27
VII.2	Vaccination : _____	28

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE.

Chapitre I : Etude de la séroprévalence de la fièvre Q dans la région de SIDI BELABBES

Mmatériels et méthodes.

I.	Objectifs de l'étude : _____	31
II.	Présentation de la zone d'étude : _____	31
III.	Echantillonnage et critères d'inclusion : _____	32
IV.	Réalisation des prélèvements _____	33
V.	Analyses sérologiques : _____	33
V.1	Matériels d'analyses : _____	34
V.2	Description et principe : _____	34
V.3	Mode opératoire pour Kit <i>Coxiella burnetii</i> : _____	34
V.4	Réalisation du test : _____	35
V.4.1	Préparation des échantillons : _____	35
V.4.2	Incubation : _____	37

V.4.3	Lavage : _____	37
V.4.4	Révélotion : _____	38
V.4.5	Lecture _____	38
VI.	Analyses Statistiques : _____	40
VII.	Résultats : _____	41
VII.1	Séroprévalence totale : _____	41
VII.2	Séroprévalence en fonction de la taille du troupeau : _____	41
VII.3	Séroprévalence individuelle de la Fièvre Q par rapport l'âge des brebis : _____	42
VII.4	Séroprévalence de la Fièvre Q en fonction du stade d'avortement : _____	42
VII.5	Séroprévalence de la fièvre Q dans les différentes Daïra : _____	43
VIII.	Discussion : _____	44

Chapitre II. Caractérisation moléculaire de *Coxiella burnetii* par PCR à partir des tiques provenant des ruminants

I.	Problématique et objectifs _____	49
II.	Cadre d'étude et collecte des tiques : _____	49
III.	Conservation et transport des échantillons : _____	50
IV.	Identification des tiques : _____	50
V.	Analyses moléculaires _____	52
V.1	Extraction d'ADN : _____	52
V.1.1	Principe de l'extraction manuelle par adsorption sur colonne : _____	52
V.1.2	Protocole expérimental de l'extraction de l'ADN : _____	52
V.2	Validation de classification des tiques par PCR _____	54
V.2.1	Préparation du mélange (Mix) : _____	54
V.3	Recherche et identification des bactéries par PCR : _____	55
V.3.1	PCR standard : _____	55
V.4	Identification de <i>C. burnetii</i> par qPCR : _____	60
V.5	Séquençage _____	62
VI.	Résultats d'identification des tiques : _____	62

VI.1	Distribution des tiques en fonction leur espèces _____	62
VI.2	Distribution des tiques collectés en fonction des espèces et de la région : _____	64
VII.	<i>Résultats de recherche des bactéries pathogènes :</i> _____	66
VII.1	Résultats d'amplification par PCR : _____	66
VII.2	: Résultats d'identification moléculaire des bactéries trouvées dans les tiques. __	67
VIII.	<i>Discussion :</i> _____	72

Liste des tableaux :

<i>Tableau 1: Validation du test ELISA</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 2: Interprétation des résultats.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 3: La séroprévalence de la Fièvre Q chez les ovins dans la wilaya de Sidi Bel Abbes.</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 4: Séroprévalence de la fièvre Q en fonction de la taille du troupeau.....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 5: Séroprévalence individuelle de la Fièvre Q par rapport l'âge des brebis.....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 6: Séroprévalence individuelle de la Fièvre Q en fonction du stade d'avortement... </i>	<i>43</i>
<i>Tableau 7: La séroprévalence de la fièvre Q en fonction des différentes Daïras.</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 8: Récapitulatif sur le nombre des tiques collectées</i>	<i>50</i>
<i>Tableau 9: les caractéristiques des amorces utilisées dans la PCR de validation des espèces des tiques</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 10: Caractéristiques des amorces utilisées pour l'identification des agents pathogènes lors de la PCR standard.</i>	<i>56</i>
<i>Tableau 11: Produits du mix de PCR standard pour Coxiella burnetii et Rickettsia spp.</i>	<i>57</i>
<i>Tableau 12: Programmes du thermocycleur pour la recherche du C. burnetti.....</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 13: Programmes du thermocycleur pour la recherche du Rickettsia spp.</i>	<i>59</i>
<i>Tableau 14: Caractéristiques des amorces et sondes utilisées pour l'identification Coxiella Burnetii par qPCR.</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 15: Résultats d'identification morphologique et moléculaire des tiques collectées. ..</i>	<i>63</i>
<i>Tableau 16: Distribution des tiques collectés en fonction d'espèce et de la région.</i>	<i>64</i>
<i>Tableau 17: Résultats de recherche des bactéries dans les tiques.....</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 18: Résultats de recherche des bactéries dans les tiques en fonction de l'espèce animale.....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 19: Résultats de recherche des bactéries dans les tiques en fonction de l'espèce de tique.....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 20: Résultats de l'identification moléculaire de Coxiella burnetii et des Rickettsia spp dans les tiques.....</i>	<i>71</i>

Liste des figures :

Figure 1 : Exemple de l'invasion de <i>Coxiella burnetii</i> et la formation de (VCC) Vacuole Contenant <i>Coxiella</i> . (Capo et al. 1999)	7
Figure 2 : La voie de trafic intracellulaire de <i>Coxiella burnetii</i>	10
Figure 3: Résultats schématique d'une infection intra-utérine avec <i>Coxiella</i>	13
Figure 4: Lésions macroscopiques d'une placentite nécrotique chez une brebis (François, 2011)	15
Figure 5: Diversité des réservoirs et voies de transmission possibles de l'agent de la fièvre Q.	19
Figure 6: Présentation de la wilaya de Sidi Belabbes dans l'Algérie (BENNABI, F., et al, 2012)	32
Figure 7: Réactifs et échantillons à tester mes à température ambiante avant la réalisation du test.	35
Figure 8: Distribution de tampon, contrôle négatif, contrôle positif et les échantillons à tester.	36
Figure 9: Incubation des microplaques.	37
Figure 10: Incubation des microplaques.	38
Figure 11: Microscope utilisé dans l'identification morphologique des arthropodes. « Nikon SMZ1000 ».....	51
Figure 12: Appareil utilisé dans la mesure de quantité et la pureté de l'ADN extrait de tiques « NanoDrop 1000, Thermo Scientific » Photo personnelle.	54
Figure 13: Thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, AB Applied biosystems, California, USA) utilisé dans la réaction de PCR (Photo personnelle).	58
Figure 14: 7300 Real Time PCR System. APPLIED BIOSYSTEMS, California, USA. Utilisé pour la détection de <i>C. burnetii</i> dans les tiques	61
Figure 15: <i>Rhipicephalus bursa</i> face dorsale et ventrale au Microscope. « Nikon SMZ1000 » sous Gr. 100×. (Photo personnelle).	63
Figure 16: <i>Hyalomma excavatum</i> face dorsale et ventrale au Microscope. « Nikon SMZ1000 » sous Gr. 100×. (Photo personnelle).	64
Figure 17: Distribution des espèces des tiques dans la wilaya de Sidi Belabbes.....	65
Figure 18: Distribution des espèces des tiques dans la wilaya de Saida	65
Figure 19: Photographie de la migration sur gel d'agarose à 1,5 % des produits d'amplification par PCR d'une portion du gène <i>ompA</i> de <i>Recketsia</i> spp.	68
Figure 20: Photographie de la migration sur gel d'agarose à 1,5 % des produits d'amplification par PCR d'une portion du gène <i>ompB</i> de <i>Recketsia</i> spp.	68
Figure 21: Les courbes de représentation d'amplification de gène IS1111 de <i>C. burnetii</i> par qPCR. (Photo personnelle).....	69

Figure 22: Dendrogramme sans racine montrant la position phylogénétique de la souche de «Candidatus Rickettsia barbariae» (◆) détectée dans la présente étude, parmi les espèces valides de Rickettsia et d'autres souches de «Candidatus». La phylogénie est déduite de la captation des séquences de nucléotides ompA (553pb) par la méthode de jonction avec le voisin (1000 réplicats). Les numéros d'accessions au GenBank des séquences utilisées dans la comparaison sont indiqués entre parenthèse. 70

Abréviations :

µM : micromètre.

AND : Acide désoxy-ribo-nucléique

APSW: Abortion premature delivery stillbirth and weak offspring.

ARN: Acide ribonucléique

ATPase: Adénosine triphosphate

BET : Bromure d’Ethidium

BTM: Bulk Tank Milk.

C°: degré Celsius.

CCV : vacuole contenant *coxiella*

CFT : teste de fixation de complément

dNTP : 2'-désoxyribose Nucléoside TriPhosphate.

DO: Densité optique

Dot/Icm: defect in organell trafficking/intracellular multiplication.

DSA : direction des services agricoles

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

GTPase : Enzymes qui lient et hydrolysent la guanosine triphosphate (GTP),

IFA : immunofluorescence assay

IFI : immunofluorescence indirecte

IgG : immunoglobine

IS : Séquence d’insertion

IS1111 : Insertion séquence.

IV : intraveineuse

LAMP1 : glycoprotéine membranaire associée au lysosome

LCV : large cell variant

LOS : Lipooligosaccharides

LPS : Lipopolysaccharid

LVRT : laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen.

MB : Megabase.

MET : Microscope électronique à transmission.

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium.

MLVA : multi-locus variable number of tandem repeats assay.

MST : multispacer sequence technique.

OIE : L’office international des épizooties

OR: Odds Ration

PCR: Polymerase chaine reaction

PH: potentiel hydrogène

qPCR: Real-time PCR.

R.: *Rickettsia*

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Rh.: *Rhipicephalus*

RR : Risque Relatif

SC : sous cutanée

SCV: small cell variant

SDC: Small Dense Cell

T⁺ : Témoin positif.

T4SS : The type IV secretion system.

TBE : Tris Borique acide EDTA

I. INTRODUCTION :

La fièvre Q est une zoonose causée par une bactérie intracellulaire obligatoire *Coxiella burnetii* (Arricau-Bouvery, Rodolakis., 2005), elle appartient au sous-groupe des γ -protéobactéries (Chmielewski T, Tylewska-Weirzbanowska S., 2012). Cette bactérie affecte plusieurs espèces animales, notamment les mammifères tels que les ruminants, les équidés, les chiens, les chats, les primates et l'homme. D'autres espèces animales comme les poissons, les amphibiens et les reptiles sont également touchées par cette bactérie (Parker NR et al., 2006). Les animaux domestiques tels que les bovins, les ovins et les caprins sont essentiellement les réservoirs principaux du *C. burnetii* et sont incriminés en tant que sources d'épidémies de la fièvre Q humaine (Berri M et al., 2003)

C. burnetii se transmet principalement par voie aérienne, les poussières et les aérosols provenant de matrices animales contaminées par *C. burnetii* constituent une source de transmission de *C. burnetii* à l'homme (Karagiannis I et al., 2005 ; De Bruin A et al., 2011). Cependant, le matériel clinique contaminé et le lait non pasteurisé peuvent constituer une source supplémentaire d'infection par la fièvre Q chez l'homme (LeJeune JT et Rajala-Schultz PJ., 2009). Les tiques sont considérées comme le principal réservoir naturel de *C. burnetii* et sont responsables de la propagation de l'infection chez les animaux sauvages et parfois de sa transmission aux animaux domestiques (Norlander L., 2000).

Chez l'animal, la bactérie se trouve principalement dans l'appareil reproducteur en engendrant principalement des avortements ou la stérilité (Fenollar F et al., 2001). Par ailleurs, chez l'homme, l'infection causée par *C. burnetii* se ressemblant à une grippe aiguë, à l'hépatite, à la pneumonie et à l'endocardite chronique. La maladie peut toucher différents âges et elle est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes. La mortalité dans les cas chroniques peut atteindre 1 à 11% (Fenollar F et al., 2001).

Des tests sérologiques comme ELISA sont habituellement utilisés dans les enquêtes sérologiques pour la détection des anticorps chez le cheptel animaux (LeJeune JT et Rajala-Schultz PJ., 2009). Néanmoins, de la pathogénie de la maladie, l'excrétion de la bactérie peut se produire avant l'apparition d'un seuil détectable des anticorps dans le sérum. Pour cela, des outils de la biologie moléculaire sont actuellement nécessaires pour la détection de l'agent

pathogène dans les échantillons animaux. La détection de l'ADN de *C. burnetii* chez l'animal peut être réalisée par PCR dans un large éventail des échantillons cliniques, notamment ; les pertes vaginales, les produits d'avortement, les matières fécales, le lait, l'urine et le sang (Nicollet P et Valognes A., 2007 ; Rodolakis A et al., 2007). Plus récemment, le séquençage est devenu la méthode la plus discriminatrice utilisée dans les enquêtes épidémiologiques pour la détection des souches de *C. burnetii* chez les animaux d'élevage (Angen O et al., 2011), cette méthode est utile pour la détection de la bactérie dans les échantillons clinique comme le sang et même chez le vecteur tiques (Berri M et al., 2000).

Historiquement, les premiers cas de la fièvre Q ont été signalés dans l'Algérie en 1948 par Portier et al. (Portier A. 1948) à Alger. Plus tard, des épidémies ont été rapportées à Batna (dans l'armée française en 1955 et 1957) et à Tlemcen (également dans l'armée) (Rey D et al., 2000). Actuellement, en Algérie, peu d'information sont disponible sur la prévalence de la fièvre Q car les outils de diagnostic ne sont pas facilement disponibles. En conséquence, peu d'études ont été réalisées sur la fièvre Q dans le cheptel animal et nous n'avons pas d'une carte épidémiologique précise de cette maladie dans toutes les régions du pays.

Les deux willayas de Sidi Bel Abbes et Saida situant dans l'ouest Algérien sont des zones à vocation agricole caractérisées par des élevages animaux très diversifiés, la région nord de Sidi Bel Abbes est connue par la prédominance des élevages bovin et aviaire tandis que la willaya de Saida et la région sud Sidi Bel Abbes sont caractérisées par des élevages ovins et caprins. Sachant qu'aucune étude de la séroprévalence de la fièvre Q n'a été réalisé dans cette région, plus loin la détection de *C. burnetii* par des essais moléculaires n'a été effectué. A partir de tous ces éléments d'introduction, que nous avons menée cette étude visant les objectifs suivants. En premier lieu, estimer la séroprévalence troupeaux et animal de la fièvre Q dans la Wilaya de Sidi belabbes et en deuxième objectif l'identification et la caractérisation moléculaire des souches bactériennes existant chez les tiques collectées des ruminants dans la région d'étude.

Première partie.

Revue de littérature

I. Historique :

Coxiella burnetii est une bactérie intracellulaire pathogène, Gram négatif. C'est l'agent causatif de la fièvre Q. « Q » signifie « Query » et non le Queensland, en Australie, où le premier foyer de cette maladie inconnue a été observé (Derrick., 1937). Cette épidémie de maladie fébrile s'est produite en 1935 chez neuf patients qui travaillaient dans un abattoir de Brisbane. Derrick a transmis la maladie à des Cochon d'Inde en injectant du sang des malades à ces animaux. Cependant, ses tentatives pour visualiser l'agent infectieux ont été infructueuses (Derrick., 1937). Derrick soumit les tissus infectés de Cochon d'Inde à Frank Macfarlane Burnet qui, avec Mavis Freeman, reproduisit la réaction fébrile caractéristique chez les Cochons d'Inde (Burnet et Freeman., 1937). Ils ont observé que l'agent était « filtrable avec difficulté » et que des frottis de tissu splénique infecté contenaient des organismes qui semblaient être de « nature à rickettsies ». En outre, ils ont observé que des suspensions de tissu clarifié provenant de Cochon d'Inde infectés agglutinés lorsqu'elles ont été mélangées avec le sérum de patients convalescents de la fièvre Q. Les suspensions, cependant, n'ont pas réussi à s'agglutiner lorsqu'elles ont été mélangées à des sérums de patients atteints de *Rickettsia typhus*

Presque simultanément à Hamilton, dans le Montana, aux États-Unis, un agent inconnu a été découvert dans le cadre d'une étude de terrain sur l'écologie de la fièvre boutonneuse de Rocky Mountain. Les tiques de *Dermacentor andersoni* collectées à Nine Mile, dans le Montana, étaient nourries de sang de Cochons d'Inde, dont l'un développait une maladie fébrile ne simulant pas la fièvre boutonneuse de Rocky Mountain (Davis et Cox., 1938). L'agent désigné de Nine Mile pouvait être passé en série chez des Cochons d'Inde, était filtrable et ne poussait pas en culture axénique, ce qui indique que l'agent n'était pas une "vraie" bactérie, par exemple *Francisella tularensis*. Selon Davis et Cox (1938), l'agent présentait des caractéristiques à la fois bactériennes et virales.

Le lien entre les agents de Nine Mile et de la fièvre Q a été découvert par hasard en raison d'une infection contractée en laboratoire par l'agent Nine Mile. La patiente présentait des signes et des symptômes remarquablement similaires à la fièvre Q (Dyer., 1938), et des études de protection croisée ultérieures ont confirmé que les agents de la fièvre Q et de Nine Mile étaient très probablement le même agent pathogène (Dyer., 1939). Comme l'organisme ne se comportait pas exactement comme une rickettsie typique, l'agent a été placé dans un nouveau

genre de la famille *Rickettsiaceae*, du genre « *Coxiella* » et de l'espèce « *Burnetii* » en l'honneur de Cox et Burnet, respectivement. (McDade., 1990).

II. Etude de la bactérie :

II.1 Taxonomie :

Bien que classifiée comme bactérie Gram-négative avec une membrane similaire à d'autres bactéries Gram-négatives, *C. burnetii* n'est pas facilement colorable par la technique de Gram, mais est généralement visualisée à l'aide de la coloration de Gimenez (Gimenez., 1964). Le rétablissement précoce de *C. burnetii* chez les tiques et son style de vie intracellulaire obligatoire ont abouti à la classification initiale de cette bactérie dans la subdivision α -1 de *Protéobactéria* de la famille des *Rickettsiaceae* et de la tribu des *Rickettsia*, ainsi que des genres *Rickettsia* et *Rochalimaea* (ensuite reclassés dans le genre *Bartonella* de la famille des *Baronellaceae* appartenant à la subdivision α -2 de *Proteobacteria*) (Maurin et Raoult 1999).

Des études phylogénétiques basées sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S reclasse la bactérie dans l'ordre des *Legionellales*, dans le groupe des *Gammaproteobacteria* (Stein et al., 1993). Sa position actuelle est donc la suivante : *C. burnetii* faisant partie du genre *Coxiella* est placée dans le domaine des *Bacteria*, le phylum des *Proteobacteria*, la classe des *Gammaproteobacteria*, l'ordre des *Legionellales* et la famille des *Coxiellaceae* (Seshadri et al., 2003; Arricau-Bouvery et Rodolakis., 2005).

II.2 Caractéristiques morphologiques :

Coxiella burnetii est l'agent étiologique de la fièvre Q zoonotique, qui a une distribution presque mondiale (Marrie., 2010). Ce coccobacille pléomorphe à gram négatif (0,2–0,4 μm de large, 0,4–1 μm de long) est un agent pathogène intracellulaire obligatoire de par sa nature, avec un temps de doublement estimé à 12–20 h (Zamboni et al., 2002).

Il existe sous trois formes différentes : la variante à grande taille (large-cell variants « LCV »), la variante de petite taille (small cell variant « SCV ») et la variante dense et petite (small dense cells « SDC ») (Heinzen et al., 1999). Ces trois formes sont différentes l'une de l'autre au regard de leur morphologie, composition antigénique et leur résistance aux agents physiques et chimiques. (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Il existe une variation de

phase, similaire à celle de *Salmonella*, dans laquelle le lipopolysaccharide (LPS) varie chimiquement comme le LPS virulent de type I « lisse » de phase I ou le LPS « rugueux » de phase II associé à *C. burnetii* non virulent.

II.3 Organisation génomique :

Les génomes de plusieurs souches de *C. burnetii* ont maintenant été séquencés et ont une taille variant d'environ 1,9 à 2,2 megabases (Mb). Ils sont organisés en chromosomes circulaires associés à un plasmide autonome ou à des séquences apparentées à un plasmide intégré (Seshadri et al., 2003). Il existe actuellement quatre types de plasmides désignés QpH1, QpRS, QpDG, QpDV, ainsi qu'un plasmide sans désignation provenant d'un isolat chinois de *C. burnetii* (Jager et al., 2002). Les alignements de séquences et les expériences d'hybridation croisée ont permis de définir une région centrale d'environ 16 kb, présente sur tous les types de plasmides (Willems et al., 1997; Savinelli et Mallavia., 1990). La présence conservée de cette séquence dans toutes les souches de *C. burnetii* analysées suggère que cette séquence plasmidique est une partie essentielle du génome. La caractérisation initiale de ces plasmides a révélé que QpH1 était associé à des isolats d'infection aiguë, tandis que le plasmide QpRS était associé à des isolats d'infection chronique (Samuel et al., 1985). Cependant, une étude ultérieure démontrant que les isolats de la fièvre Q chronique portaient QpH1 ou QpRS, suggérant que le type de plasmide n'était pas un prédicteur cohérent de la présentation de la maladie (Thiele et Willems., 1994).

Le nombre élevé de pseudogènes prédits suggère qu'il y a une réduction dans l'évolution du génome de *C. burnetii*, alors que l'évolution réductrice est une caractéristique commune des bactéries intracellulaires (Seshadri et al., 2003). De plus, le génome de *C. burnetii* contient un grand nombre de séquences d'insertion (IS) (32 dans le génome de la souche Nine Mile), ce qui est inhabituel pour les bactéries intracellulaires en supposant qu'il y aurait peu de possibilité de transfert de gène, ce qui implique que le mode de vie intracellulaire de *Coxiella* est une adaptation relativement récente (Seshadri et al., 2003; Raghavan et al., 2008).

II.4 Cycle de développement :

C. burnetii a un cycle de vie très compliqué qui, implique différentes variantes de cellules (McCaul et Williams., 1981) :

II.4.1 Les variantes de petite taille : (En anglais « small cell variant SCV »).

Généralement ont apparait sous une forme bâtonnets et d'une longueur de 0,2 à 0,5 μm avec de la chromatine hautement condensée (Coleman et al., 2004). Le SCV est la forme trouvée dans l'environnement extracellulaire et elle est hautement résistant à la chaleur, à la dessiccation, aux chocs osmotiques, aux rayons ultraviolets et à divers désinfectants chimiques (Heinzen et al., 1996). En plus d'être extrêmement résistante, *C. burnetii* est métaboliquement inactif sous cette forme SCV (Coleman et al., 2004). À l'origine, il avait été suggéré que *C. burnetii* pouvait produire des spores qui se développaient en SCV puisque McCaul et Williams ont observé une particule semblable à une spore dans les variantes à grandes cellules (LCV) (McCaul et Williams., 1981). Cependant, le fait de ne pas colorer ces particules avec une coloration aux spores (acide dipicolinique) ne corrobore pas cette hypothèse et le séquençage du génome a démontré l'absence totale d'homologues pour la formation des spores. (Williams., 1991; Seshadri et al., 2003).

II.4.2 Les variantes de grande taille : (en anglais « large cell variant LCV »)

Sont typiquement pléomorphes, de grosses cellules de forme allongée, mesurant de 0,7 à 2 μm et métaboliquement actifs (Coleman et al., 2004). Lors de l'internalisation, l'endosome commence sa maturation dans une vacuole parasito-phore et *C. burnetii* commence le passage du SCV au LCV. Ce changement intervient en réponse à l'acidification de la vacuole contenant Coxiella (VCC) (pH 4,7–4,8) (Hackstadt et Williams., 1981). Huit heures après l'infection, les vacuoles contenant à la fois des SCV et des LSV par MET peuvent être visualisées. Cependant, 16 heures après l'infection, les VCC ne contiennent que des LCV, ce qui indique que la transition est complète (Coleman et al., 2004). Cette transformation de SCV en LCV se produit sans réplication et a été classée comme la période de latence initiale de la croissance (Coleman et al., 2004).

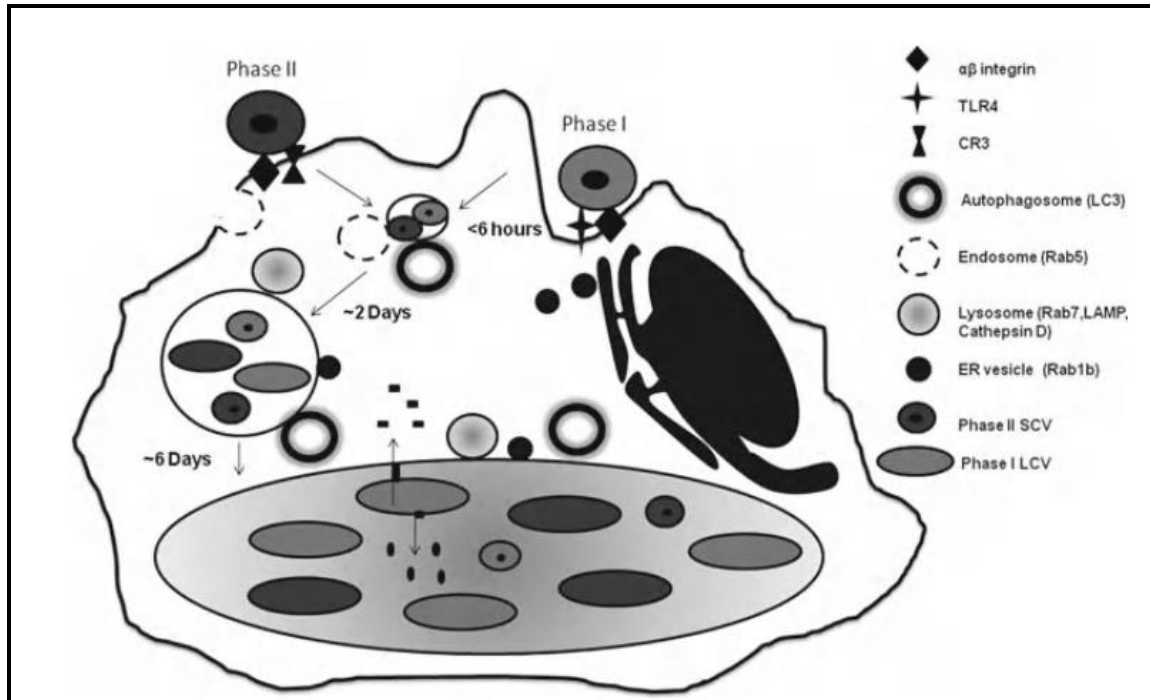


Figure 1 : Exemple de l'invasion de *Coxiella burnetii* et la formation de (VCC) Vacuole Contenant *Coxiella*. (Capo et al. 1999)

II.4.3 Variation de phase antigénique :

C. burnetii ne produit pas de cytotoxines évidentes et l'identification du facteur de virulence a été entravée par l'incapacité de modifier génétiquement cet organisme jusqu'à présent (Omsland et al., 2011b; Beare et al., 2011). Le lipopolysaccharide (LPS) est le seul facteur de virulence génétiquement confirmé de *C. burnetii* où les bactéries de phase I sont virulentes alors que les bactéries de phase II sont avirulentes (Skultety et al., 1998). La variation de phase chez *C. burnetii* a été utilisée pour décrire un phénomène de passage chez un hôte non immunologiquement compétent dans lequel une bactérie de phase I devient une bactérie de phase II lors de son passage dans une culture tissulaire ou des œufs embryonnés (Moos et Hackstadt., 1987). Les différences entre les *C. burnetii* de phases I et II sont similaires mais non identiques à la variation de LPS lisse et rugueux des *Enterobacteriaceae* (Amano et al., 1987). Pendant le passage, les mutants rugueux sont favorisés en croissance et la population de *C. burnetii* passe de chimotypes lisses à des chimotypes essentiellement rugueux. Le passage de la phase I à la phase II résulte de la perte des sucres virenose méthylés et dihydrohydroxystreptose, ainsi que d'autres sucres comprenant le noyau de l'antigène O (Toman et

Kazar., 1991; Amano et al., 1987). De plus, la transition de la phase I à la phase II est souvent, mais pas toujours, associée à une importante délétion chromosomique contenant un certain nombre de gènes dont on prévoit qu'ils sont associés à la biosynthèse du LPS ou du LOS (dans l'isolat RSA493 de Nine Mile I) (Thompson et al., 2003). Étant donné que la variation du LPS est associée à une suppression chromosomique importante, il ne s'agit pas d'une variation de phase au sens classique du fait que les variants de LPS rugueux ne sont pas en mesure de revenir au chimotype lisse. En outre, si on injecte une population mixte de *C. burnetii* phase I et phase II à un hôte immunocompétent (modèle animal), les bactéries en phase II, incapables d'infecter les cellules, sont éliminées. Ce qui laisse une population homogène de bactéries en « phase I ».

II.5 Facteurs de virulence :

Le LPS est un facteur de virulence pour *C. burnetii* pour plusieurs raisons. Les organismes de phase II sont sensibles au complément, alors que ceux de phase I sont résistants au complexe d'attaque membranaire du complément (Vishwanath et Hackstadt., 1988). Deuxièmement, le LPS de *C. burnetii* en phase I inhibe stériquement la liaison des anticorps aux protéines à la surface bactérienne (Hackstadt., 1988). De plus, le LPS est probablement impliqué dans d'autres formes d'évasion immunitaire.

Les facteurs de virulence chez les micro-organismes pathogènes sont normalement définis en produisant des mutations chez des bactéries infectieuses de type sauvage et en recherchant des phénotypes avirulentes in vitro ou in vivo. Le séquençage des premiers gènes identifiés comme tels par le premier isolat de *C. burnetii* devrait être impliqué dans l'adhérence, l'invasion et la modulation de l'hôte ont considérablement élargi nos connaissances des modèles sur la pathogénie de cet organisme (Seshadri et al., 2003). La prédiction de facteurs de virulence potentiels ainsi que la caractérisation d'une niche intracellulaire unique occupée par *C. burnetii* ont confirmé les hypothèses selon lesquelles sa stratégie principale de virulence est l'évasion immunitaire.

II.6 Ethio-pathogénie :

L'infection à *C. burnetii* se produit par l'inhalation des aérosols contaminés, ses principales cellules cibles sont les macrophages et les monocytes circulants, mais elle peut également infecter un grand nombre d'autres types cellulaires (Norlander., 2000). *C. burnetii*

pénètre dans la cellule par un phénomène de phagocytose passive actine-dépendante (Baca et al., 1993, Tujulin et al., 1998). Elle se lie aux macrophages par les $\alpha_v\beta_3$ intégrines comme récepteur principal et pénètre dans la cellule par phagocytose dépendante de RAC1 (Capo et al., 1999 ; Dellacasagrande et al., 2000). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est impliqué dans l'élimination des cellules apoptotiques par phagocytose, et ceci est généralement associé à une inhibition de l'inflammation (Dupuy and Caron., 2008). Ainsi, la possibilité d'utiliser l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour l'invasion permet au *C. burnetii* d'éviter l'induction d'une réponse inflammatoire. Donc, elle échappe au système immunitaire.

Ensuite *C. burnetii* va dévier la phagocytose à son utilité, ainsi la vacuole contenant des *Coxiella* (VCC) résultant de la phagocytose acquiert la GTPase Rab5 environ 5 min après son internalisation. Cette GTPase produisant la fusion entre les endosomes précoces et la VCC, entraînant une acidification jusqu'à un pH 5,4 (à travers un processus incomplètement déterminé) et l'acquisition de la protéine marqueur de l'endosome précoce, EEA1 ; ce qui lui confère une des caractéristiques d'un développement du phagosome normal. Cependant, à l'inverse aux phagosomes, la VCC obtient aussi les marqueurs auto-phagosomaux LC3 (microtubule-associated protein light-chain 3). Le phagosome tardif perd GTPase Rab5 et acquiert la GTPase Rab7, LAMP1 (glycoprotéine membranaire associée au lysosome), LAMP2 et l'ATPase vacuolaire, une heure environ après son internalisation, qui pompe protons dans le phagosome mature pour diminuer encore le pH luminal à environ pH 5 (Kinchen et Ravichandran., 2008). Enfin, le phagosome fusionne avec des compartiments lysosomaux pour acquérir cathepsines, hydrolases et l'ATPase vacuolaire qui réduit encore le pH à environ pH 4,5 (Flannagan et al., 2012 ; Kinchen et Ravichandran., 2008).

Cette opération est significativement tardée par rapport à l'acquisition de phagolysosome normale de la cathepsine D. Le retard dans le développement de la VCC permet la transformation des variants de petite taille en variants de grande taille. De 8 h à 2 jours après l'internalisation, la VCC s'agrandit pour occuper un espace de plus en plus volumineux dans le cytoplasme de la cellule hôte qui due à la synthèse de protéines par la bactérie.

Ce processus dépend de la synthèse des protéines bactériennes et implique à la fois le recrutement de la GTPase Rho et Rab1B à la membrane de CCV. RHO GTPase est susceptible

d'être impliqué dans le maintien de la grande vacuole, tandis que le recrutement de Rab1B de l'ER peut faciliter l'acquisition de membranes supplémentaires pour créer cette CCV spacieux.

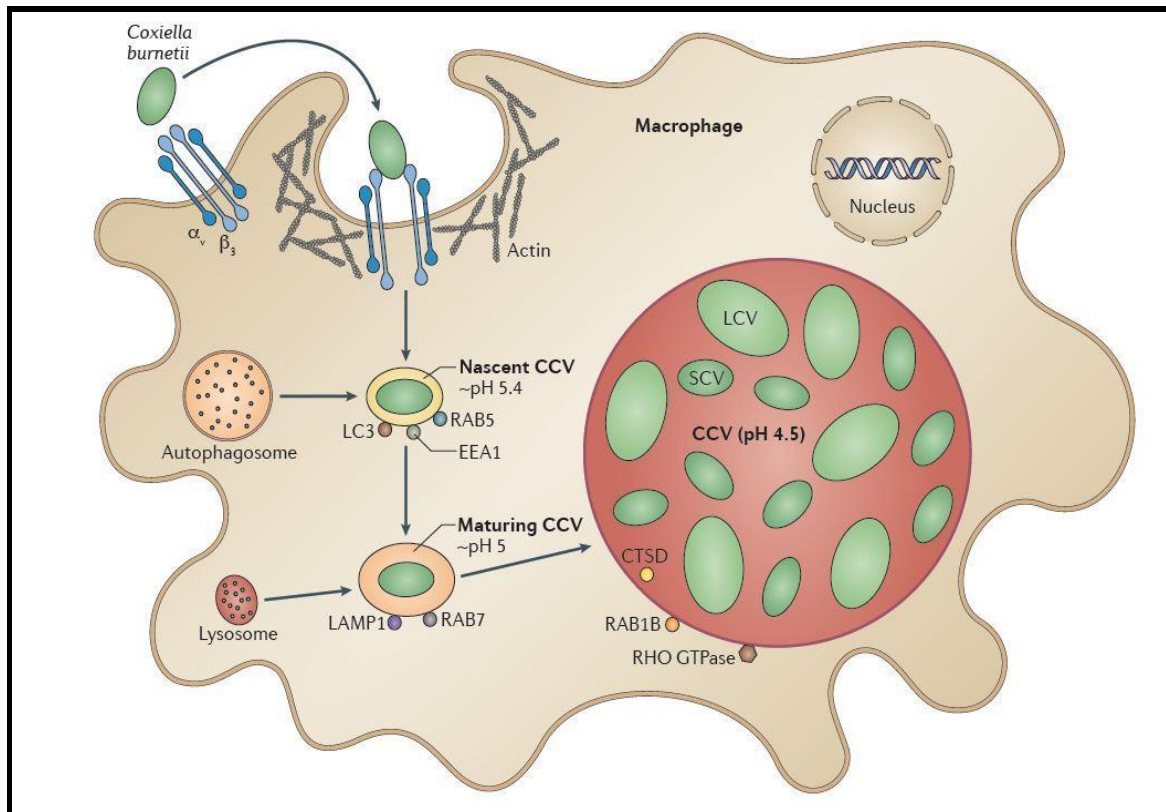


Figure 2 : La voie de trafic intracellulaire de *Coxiella burnetii*. (Van Schaik et al. 2013)

Comme étant que la culture de *C. burnetii* est difficile, elle ne pouvait s'effectuer que sur œufs embryonnés, lignée cellulaire, jusqu'à ce qu'une milieu axénique soit adopté par Omsland et ses collaborateurs (Omsland et Heinzen., 2011; Omsland et al., 2009.). Le développement de cette culture axénique a permis de mieux déterminer les facteurs de virulence de *C. burnetii*.

L'utilisation de technique de séquençage dans l'étude du génome de *C. burnetii* a permis de révéler que leur génome contient de gènes encodant les composants du système sécrétoire de type IV (T4SS) relié au système Dot/Icm (« defect in organelle trafficking/intracellular multiplication ») de *Legionella pneumophila* (Seshadri et al. 2003). Dernièrement, il fut prouvé que le système Dot/Icm est nécessaire pour la survie de *Coxiella* dans les cellules hôtes (Carey

et al., 2011 ; Beare et al., 2011) et principalement en la préservant de l'apoptose (Luhmann et al., 2010). En effet, il existe un autre candidat effecteur « AnkG » a un effet anti-apoptotique qui semblait être en se fixe sur la protéine mitochondriale pro-apoptotique p32 de l'hôte (Beare et al., 2011). D'autres études récentes ont révélé que deux (2) autres protéines anti-apoptotiques ont été déterminées. Ce sont les protéines effectrices T4SS CaeA et CaeB (*C. burnetii* « anti-apoptotic effector ») qui protègent de *C. burnetii* en inhibant l'apoptose de la cellule hôte (McDonough et al., 2013).

Les connaissances concernant la pathogénie de la fièvre Q chez les petits ruminants peuvent aider à comprendre l'évolution de la maladie et son épidémiologie. Toutefois, seules quelques études ont été publiées fournissant des informations sur la pathogénie chez les ovins et les caprins (Lennette et al., 1952; Martinov et al., 1989; Sanchez et al., 2006; Roest et al., 2012). Après l'inoculation à des chèvres gravides, les cellules trophoblastiques de l'allanto-chorion sont les cellules cibles principales de *C. burnetii*. Bien que l'infection initiale des trophoblastes devienne inconnue, de plus en plus de trophoblastes s'infectent et l'allanto-chorion montre des signes d'inflammation de plus en plus graves. En revanche, dans les trophoblastes couvrant les villosités cotylédonaires, impliqués dans l'échange de gaz et d'éléments nutritifs, *C. burnetii* n'a pas été détecté (Roest et al., 2012); cela pourrait expliquer l'absence de mort prématurée du fœtus. Au lieu de cela, les fœtus peuvent mourir soit peu de temps avant ou pendant l'avortement provoqué par une inflammation, soit peuvent être nés vivants. Ce schéma diffère des résultats concernant la brucellose caprine et la chlamydie, dans lesquels des altérations de la liaison foeto-placentaire conduisent à la mort fœtale aboutissant à un avortement (Anderson et al., 1986a; Anderson et al., 1986b; Buxton et al., 1990; Rodolakis et al., 1998)

III. Présentation clinique :

III.1.1 Chez les petits ruminants :

Chez les ovins, L'infection aiguë produit expérimentalement a été étudiée. Des brebis inoculées par voie intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale avec une souche ovine de *C. burnetii* "Tchilnov". Les brebis ont développé des signes d'hyperthermie pendant 2-3 j, de tachypnée, d'anorexie, Plusieurs jours avant l'agnelage, l'état général des brebis s'est détérioré et elles

mettent bas à terme des agneaux mort-nés ou morts peu après leur naissance accompagnés d'un placenta nécrotique et enflammé (Martinov et al., 1989)

Six brebis gestantes autour du 100ème jour, ont été inoculées en SC par la souche de *C. burnetii* Nine Mile dans une autre étude (Brooks et al., 1986). Les signes cliniques aigus n'ont pas été signalés, mais les brebis mettent bas des agneaux petits et faibles. Un placenta nécrotique accompagné d'un agneau qui est mort en 2ème jours d'âge. L'évolution clinique aiguë dans les cas spontanés n'a pas été signalée.

Complexe de l'avortement, mise bas prématuré, mortinatalité et d'animaux chétifs : (Abortion, premature delivery, stillbirth and weak offspring APSW)

L'infection de l'utérus gravide peut donner lieu à de nombreuses affections, telles que l'avortement, la naissance prématurée, la mortinatalité et une progéniture faible (appelée ici complexe APSW), en plus d'une progéniture cliniquement normale infectée de façon congénitale ou non.

La figure 3 illustre la complexité des événements pouvant conduire à ces différents résultats. Il est impératif de comprendre cette complexité et les différentes manières dont une infection peut se développer dans le placenta et le fœtus lors de l'interprétation des données de laboratoire relatives aux naissances d'animaux chétifs. Il est également important de reconnaître que des conditions telles que la mortinatalité et une naissance des animaux chétifs ne peuvent pas être considérées comme des conditions isolées mais comme le résultat possible d'une infection intra-utérine couvrant l'ensemble du complexe APSW.

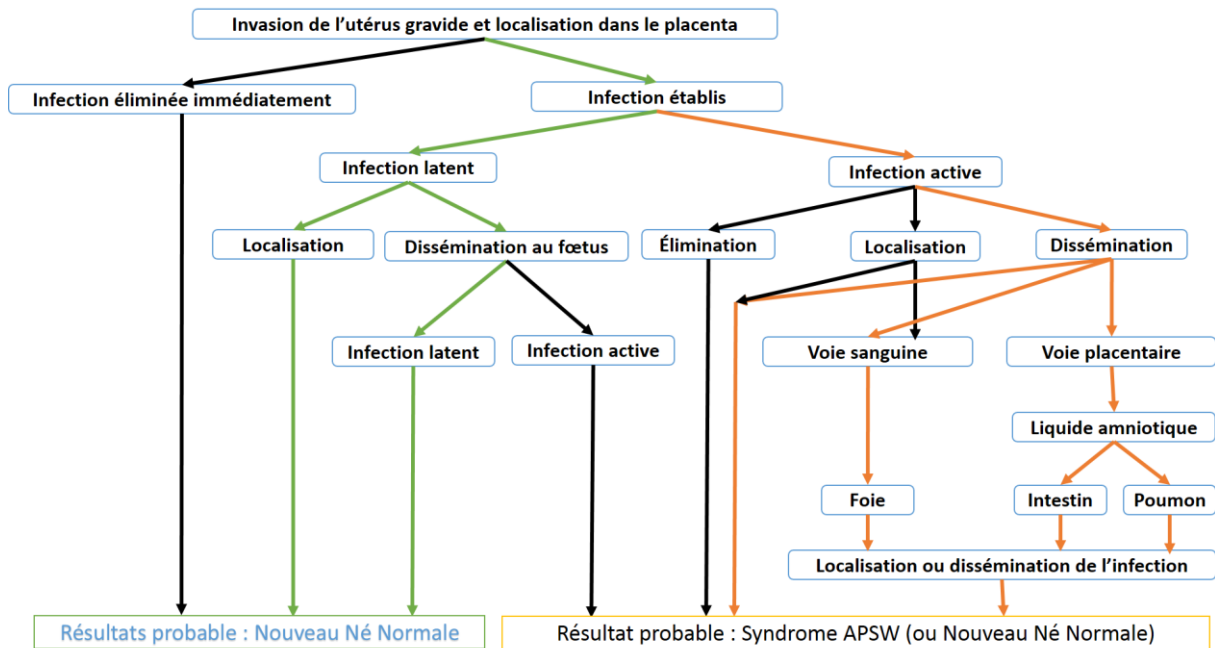


Figure 3: Résultats schématisés d'une infection intra-utérine avec *Coxiella*

L'issue d'une infection intra-utérine avec *C. burnetii* dépend (entre autres) de la virulence de la souche, des réponses immunitaires maternelles et fœtales, de la gravité de l'infection / lésion placentaire, de la propagation possible et de la dissémination chez le fœtus, de l'âge de gestation et du nombre des fœtus infectés. Adapté à la situation sur le terrain, cela signifie que la fièvre Q épidémique en troupeau ne doit être suspectée que si le complexe APSW est atteint dans son intégralité, mais pas si une seule affection, telle que l'augmentation du taux de mortalité.

III.1.2 Chez les bovins :

Chez les bovins, les principales manifestations pathologiques de la fièvre Q associées à des infections chroniques sont représentées par l'infertilité, la métrite et la naissance des veaux chétifs, plus rarement par les avortements et les mortalités. Dans les troupeaux asymptomatiques mais séropositifs, *Coxiella* est presque exclusivement excrété dans le lait. L'excrétion peut durer plusieurs mois (voire plus de 32 mois) et peut être continue ou intermittente et peut, dans certains cas, être associée à une mammite sub-clinique chronique (Rodolakis et al., 2007). Dans les troupeaux de bovins présentant des troubles de la reproduction,

les femelles infectées transmettent principalement *Coxiella* par le biais de produits de la naissance, mais également par les matières fécales, l'urine et le lait (Arricau Bouvery et al., 2003). L'élimination du microorganisme par ces voies peut durer plusieurs mois, même chez les sujets qui n'ont pas présenté de problèmes lors de la parturition (Berri et al., 2005b).

III.1.3 Chez l'homme :

Des études récentes ont montré que 40 % des personnes infectées par *C. burnetii* ont développé une fièvre Q aiguë et ceci après 10 à 17 jours incubation, et 1 à 5 % parmi les personnes infectées ont évolué une forme chronique de la maladie (Million et al., 2009). 60 % des personnes infectées resteront asymptomatiques après l'infection. Ils présenteront qu'uniquement une séroconversion. Dans les formes symptomatiques, les patients ont présenté un syndrome pseudo-grippal spontanément résolutif ou une pneumopathie ou une méningo-encéphalite ou une hépatite et 5 % des personnes infectées sont hospitalisés. (Raoult et al., 2000; Anderson et al., 2013).

Les femmes enceintes, présentent un risque de mort fœtale in utero et de fausse couche, même si la plupart du temps l'infection est cliniquement asymptomatique (Stein et Raoult., 1998). La Fièvre Q chronique est définie par une infection évoluant depuis plus de six mois (Bossi et al., 2004) c'est la cause la plus fréquente d'endocardite (Stein et Raoult., 1995). Celle-ci survient chez les patients à valvulopathie préexistante ou porteurs d'une prothèse valvulaire (Salamand et al., 2002), et concerne habituellement la valve aortique, plus rarement la valve mitrale et les cas de valvulopathie préexistante ou de greffe valvulaire.

III.2 Lésion :

L'infection expérimentale par *C. burnetii* a été étudié chez des chèvres gestants par Sánchez et al en 1986, 12 chèvres ont 90 jours de gestation ont été inoculés SC par une souche connu de *C. burnetii*, Les fœtus ont été examinés soit lors de l'euthanasie des chèvres le jour de la gestation 116 ou 130, soit après l'avortement (jour 132 ± 4). Le développement des lésions placentaires était apparemment retardé après l'invasion bactérienne du placenta, *C. burnetii* ayant infecté l'allantochorion inter-cotyldonaire et certains placentomes le 26^{ème} jour après l'inoculation, mais les modifications histopathologiques étaient soit absentes, soit bénignes. Au jour 40 après l'inoculation, une inflammation nécrosante et suppurée généralisée s'était

développée dans les cotylédons et le placenta inter-cotylédonaire. L'antigène de *C. burnetii* a été détecté dans les trophoblastes dilatés et libéré dans les débris par l'immunohistochimie « IHC » et confirmé par PCR. Les fœtus avortés lors de 42^{ème} jours sur 4 après l'inoculation présentaient des lésions similaires. Les analyses par PCR de l'ADN de *C. burnetii* ont montré que l'ADN bactérien était présent dans le foie et la rate du fœtus le 26^{ème} jour après l'inoculation, ainsi que dans le poumon, le contenu abomasal et le liquide péritonéal au 40^{ème} jour après l'inoculation et dans les cas d'avortement. La présence d'ADN bactérien n'était généralement pas accompagnée de lésions ou d'une coloration positive par IHC, bien qu'une hépatite périvasculaire légère à modérée puisse être observée (Sánchez J, et al., 2006 ; Arricau-Bouvery N, et al 2005 ; Arricau-Bouvery N, et al 2003). Ces résultats indiquent que les fœtus peuvent développer une bactériémie à *C. burnetii* peu de temps après la colonisation du placenta, du moins dans un cadre expérimental (Figure 4).



Figure 4: Lésions macroscopiques d'une placentite nécrotique chez une brebis (François, 2011)

IV. Épidémiologie :

La fièvre Q a été décrite dans le monde entier, à l'exception Nouvelle Zélande (Maurin et Raoult., 1999). Le non obligation de déclaration officielle dans certains pays, la nature de la maladie « prédominance des formes asymptomatiques », le non caractéristique des signes

cliniques et la difficulté du diagnostic sont responsables d'une sous-estimation de la prévalence et l'incidence réelle de cette infection (Porter et al., 2011).

IV.1 Réservoir :

C. burnetii est fortement associé aux ruminants domestiques et le contact avec ces animaux infectés et leurs produits constitue la principale voie d'exposition aux leurs voisinage ainsi que l'être humaine à l'agent pathogène de la fièvre Q (Raoult et al., 2005). Cependant, la gamme de réservoirs naturels est vaste et comprend à la fois des mammifères sauvages et domestiques, des oiseaux et des arthropodes tels que les tiques (Maurin et Raoult., 1999). *C. burnetii* ne cause pas de maladie manifeste chez la plupart des animaux. Les exceptions sont les ovins et les caprins où la prolifération massive du microorganisme dans le système reproducteur féminin peut entraîner un avortement tardif. Ceci est en contraste avec la pathologie chez l'homme, qui survient principalement dans le système respiratoire. Les mammifères transmettent les bactéries par l'urine, les matières fécales, le lait et les produits de naissance, tels que le placenta et le liquide amniotique. Par conséquent, la dessiccation de ces substances peut déposer un nombre considérable de bactéries infectieuses dans la poussière de basse-cour. Ce matériau peut être largement dispersé par les courants d'air où il reste viable dans l'environnement pendant des années (Tissot-Dupont et al., 2004).

IV.2 Les voies de transmissions :

L'extrême résistance de cette bactérie aux agents externes la rend persistante dans l'environnement, en particulier dans les zones où des élevages de ruminants domestiques sont présents. En fait, *C. burnetii* peut être facilement transmissible par le foin ou la poussière contaminés et se propager dans l'environnement proche par le vent. Pour cette raison, des cas de fièvre Q peuvent également être retrouvés chez des patients n'ayant pas eu de contacts évidents avec des animaux (Kruszewska & Tylewska-Wierzbanowska, 1997),

IV.2.1 Voies et circonstances de contamination entre animaux :

IV.2.1.1 La voie respiratoire :

Est le mode transmission le plus habituel : l'inhalation de 10 bactéries peut provoquer une infection. Les mises-bas génèrent un risque maximal de diffusion de la bactérie. Une fois excrétées, les pseudo-spores sont capables de persister dans l'environnement plus de 100 jours (Welsh et al., 1957 ; Babudieri., 1959) et peuvent être transportées par le vent sous forme d'aérosols sur une distance de plus de 40 km (Tissot- Dupont et al., 2004).

IV.2.1.2 La voie trans-placentaire :

Chez les ruminants, la transmission par voie transplacentaire n'a pas forcément lieu. Néanmoins, les jeunes peuvent s'infecter rapidement après leur naissance.

IV.2.1.3 La transmission sexuelle :

La transmission sexuelle de la fièvre Q a été démontrée chez des souris (Kruszewska et Tylewska-Wierzbanska, 1993) et une infection viable à *C. burnetii* a été trouvée dans le sperme de taureau (Kruszewska et Tylewska-Wierzbanska, 1997).

IV.2.1.4 La voie orale :

Doit être un mode important. Par exemple, on suppose que les animaux se contaminent par léchage ou ingestion des produits de la parturition. Les facteurs favorisant la transmission (le mode d'élevage, le climat, la souche de *C. burnetii*), que ce soit à l'intérieur d'un élevage ou entre élevages, sont insuffisamment caractérisés. A priori, les taux et les périmètres de transmission sont multifactoriels et donc très variables.

IV.2.2 Voies de contamination de l'homme :

IV.2.2.1 La voie respiratoire :

Des preuves expérimentales et épidémiologiques, il ne fait aucun doute que les aérosols contaminés sont le principal mécanisme de transmission de *C. burnetii* à l'homme (Tiggert et Benenson, 1956; Gonder et al., 1979). Les personnes en contact avec des animaux d'élevage

peuvent être infectées par l'inhalation d'aérosols contaminés provenant de liquide amniotique ou de placenta ou de la laine contaminée, mais le personnel de laboratoire travaillant avec des animaux infectés est également à risque (Johnson et Kadull, 1966).

IV.2.2.2 La voie digestive :

Les mammifères libèrent également *C. burnetii* dans le lait et la consommation de lait cru pourrait donc être une source d'infection (Maurin et Raoult, 1999). Bien que le lait contaminé puisse constituer un facteur de risque d'infection par la fièvre Q (Marmion et al., 1956), les preuves tirées d'expériences dans lesquelles du lait contaminé était donné à des volontaires étaient contradictoires (Benson et al., 1963; Krumbiegel et Wisniewski, 1970). L'ingestion de fromage pasteurisé et le tabagisme peuvent également être des facteurs de risque de fièvre Q d'acquisition (Hatchette et al., 2000).

IV.2.2.3 Les autres voies de contamination :

Ont été décrites beaucoup plus rarement : piqûre de tique, transmission materno-fœtale et interhumaine (au contact d'une personne infectée lors de l'accouchement, voie sexuelle, par transfusion sanguine). Il s'avère que le risque d'infection est plus élevé pour la population rurale (éleveurs, vétérinaires, personnels de laboratoire, techniciens d'abattoirs). Néanmoins, des bouffées épidémiques surviennent plutôt en zone urbaine ou semi-urbaine, car les personnes n'ont pas acquis d'immunité et apparaissent cliniquement plus sensibles à la fièvre Q. Les chats et chiens sont parfois à l'origine de cas sporadiques (manipulation des animaux mettant bas, des litières contaminées à la suite de mises bas). Les modalités de contamination à l'homme sont donc nombreuses et complexes et méritent d'être investiguées.

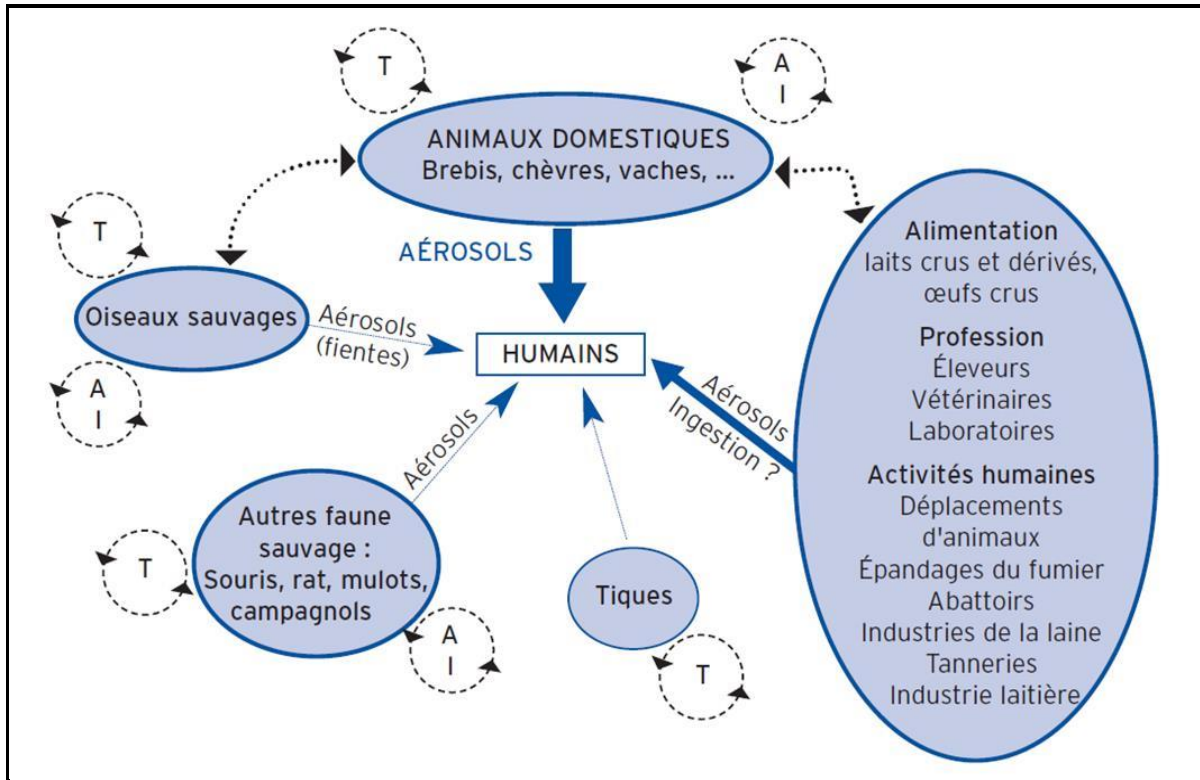


Figure 5: Diversité des réservoirs et voies de transmission possibles de l'agent de la fièvre Q.

Modes de transmission : A : par voie aérienne ; I : par ingestion ; T : par les tiques

V. Diagnostic :

L'extrême virulence de *C. burnetii* nécessite l'utilisation d'un laboratoire de niveau de sécurité P3 pour le traitement des échantillons contaminés et l'isolement. La culture de l'agent pathogène doit être réalisés par du personnel de laboratoire expérimenté (OIE., 2010). *Coxiella burnetii* peut être démontré de différentes manières, en fonction du type d'échantillon et du but de l'enquête (Samuel et Hendrix., 2009; Sidi-Boumedine et al., 2010).

Pour le diagnostic des animaux dans le contexte d'avortements en série et de mort-nés, les échantillons doivent être prélevés sur des fœtus avortés, le placenta et les écoulements vaginaux peu après l'avortement ou la mise-bas. Le diagnostic doit toujours inclure une investigation différentielle des principaux agents abortifs. La détection précoce d'une épidémie d'avortements provoqués par la fièvre Q dans un troupeau et des mesures correctes de confinement biologique sont essentielles pour prévenir et limiter les voies d'infection tant environnementales qu'en provenance de la ferme. Un cas positif est un troupeau présentant des signes cliniques

(avortement et / ou mortinatalité) pour lesquels la présence de l'agent a été confirmée. En règle générale, dans la pratique vétérinaire, un élevage ou un troupeau peut être considéré comme cliniquement affecté par la fièvre Q si trois circonstances se présentent : avortements ou mort-nés, présence de *C. burnetii* dans des échantillons d'animaux affectés (évaluée par analyse PCR quantitative) et présence d'animaux séropositifs (évalués par test ELISA). Les critères de l'EFSA L'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA, en anglais *European Food Safety Authority*, EFSA) (Sidi-Boumedine et al., 2010) suggérés pour un diagnostic correct de *C. burnetii* en tant qu'agent abortif dans les troupeaux de bovins et les cheptels ovi-caprins sont résumés dans les figures 3 et 4, respectivement.

V.1 Diagnostic indirect :

Les techniques indirectes comprennent le test d'immunofluorescence indirecte (IFA), le test ELISA et le test de fixation du complément (FDC) à effectuer sur des échantillons de sérum ou, dans le cas du test ELISA, également sur des échantillons de lait. Ces méthodes s'avèrent utiles pour le criblage d'un grand nombre d'échantillons, comme dans le cas de troupeaux entiers, mais ne fournissent pas de résultats clairs pour les enquêtes sur un seul animal. En fait, certains animaux peuvent rester séropositifs pendant plusieurs années après une infection aiguë, d'autres peuvent excréter *C. burnetii* avant la séroconversion et représentent donc un facteur de risque d'infection, alors que d'autres animaux ne se séroconvertissent jamais (Maurin et Raoult., 1999). Pour le moment, des tests permettant de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés n'existent pas encore.

V.1.1 Réaction de fixation du complément (CFT) :

En médecine vétérinaire, la TFC était la méthode de référence pour le diagnostic sérologique selon l'OIE (AFSSA., 2004 ; Marrie et al., 1989). La TFC utilise généralement uniquement des antigènes de phase II (Krt B., 2003 ; AFSSA., 2004). Il est capable de détecter environ 65% des sujets infectés au cours de la deuxième semaine après l'apparition des premiers signes cliniques et 90% au cours de la quatrième semaine (OIE., 2005). La TFC est plus laborieuse, moins spécifique et moins sensible que le test d'immunofluorescence indirecte (IFA) [192] ou ELISA (décrit ci-après) (Fournier et al., 1998). Une étude de Rousset et al. (Rousset et al., 2007) sur des chèvres provenant de différents troupeaux ont rapporté que les résultats de

TFC obtenus sur des sérums de chèvres avortées et de chèvres non avortantes n'étaient pas significativement différents et confirmaient le manque de sensibilité de la TFC par rapport à ELISA. La TFC, contrairement à l'ELISA, est incapable de détecter toutes les sous-classes d'IgG. Chez les ruminants, seule l'IgG1 fixe le complément et peut donc être détectée par TFC. De plus, les IgG2, les IgM et les substances antic-complément potentiellement présentes dans les sérums sont capables d'interférer avec la fixation d'IgG1 au complément en abaissant le titre d'IgG1 détecté par CFT (Rousset et al., 2009). Rousset et al. (Rousset et al., 2007) ont conseillé de ne pas utiliser le TFC pour le dépistage sérologique chez l'animal en raison de sa faible sensibilité.

V.1.2 ELISA :

La méthode ELISA est une autre méthode de diagnostic pour les cas humains et animaux. Cette méthode est plus sensible et plus facile à réaliser et à normaliser que TFC (Fournier et al., 1998). De plus, une forte association a été rapportée entre les résultats de tests ELISA fortement positifs et la survenue d'avortements chez les chèvres (Rousset et al., 2007). Comme mentionné ci-dessus, la sensibilité plus élevée de l'ELISA par rapport au TFC pourrait être due à la détection de la sous-classe d'anticorps IgG2, qui sont incapables de se lier au complément du cobaye (Krt B., 2003). En France, les tests ELISA disponibles à des fins de diagnostic vétérinaire ne différencient pas les anticorps anti-phase I et anti-phase II, mais détectent le total des anticorps (AFSSA., 2004). Les tests ELISA peuvent être automatisés, ce qui facilite les études à grande échelle (Rousset et al., 2007). Les kits ELISA humain disponibles dans le commerce sont souvent recouverts d'antigènes de phase I et de phase II. Les antigènes présents ont deux origines possibles : des antigènes de la souche américaine de *Coxiella burnetii* de Nine Mile isolés d'une tique endogène ou des antigènes d'une souche provenant de ruminants domestiques européens infectés. Les kits ELISA recouverts de ces derniers antigènes sont plus sensibles et sont conseillés pour le diagnostic sérologique (ACERSA., 2006). Dans l'étude de Guatteo et al. (Guatteo et al., 2007).

La technique ELISA peut être réalisée sur sérum, lait, colostrum ou placenta. L'ELISA reconnaît les immunoglobulines dirigées aussi bien contre les *C. burnetii* en phase I qu'en phase II, avec toutefois une réponse supérieure en présence d'antigènes solubles de phase I (Behymer et al., 1989).

V.1.3 I.F.I. (Immunofluorescence Indirecte) :

L'étude de Rousset et al. (Rousset et al., 2007) chez les caprins ont montré une bonne concordance entre les résultats IFA et ELISA. L'étude a également révélé que les résultats IFI obtenus sur des sérums de chèvres avortées et de chèvres non avortées étaient significativement différents et étaient associés à un avortement (Rousset et al., 2007). De plus, IFI est capable de détecter les deux variants antigéniques de *Coxiella burnetii* (phase I et phase II). Comme mentionné précédemment, dans les infections aiguës, des anticorps anti-phase II sont détectés. Dans les infections chroniques, des anticorps anti-phase I et anti-phase II sont présents, mais les anticorps anti-phase I sont prédominants (Fournier et al., 1998). Les anticorps anti-phase II étant présents à tous les stades de l'infection, le dépistage à des fins épidémiologiques repose sur la détection des anticorps anti-phase II (Rousset et al., 2007). Des réactions croisées avec *Legionella micdadei* et *Bartonella* ont été rapportées mais ne posent aucun problème pour l'interprétation des résultats quantitatifs (Musso et al., 1997 ; Scola et al., 1996). En médecine humaine, l'IFI distingue les IgG et les IgM. Les titres d'IgG anti-phase II supérieurs ou égaux à 200 et d'IgM anti-phase II supérieurs ou égaux à 50 correspondent à une infection aiguë de valeur prédictive de 100%. Un titre élevé d'IgM isolé (≥ 50) peut correspondre au début d'une infection aiguë, à condition que la possibilité d'un faux positif puisse être rejetée. Une infection chronique est caractérisée par un titre élevé en IgG anti-phase I (≥ 800) avec une valeur prédictive de 98% pour un titre de 800 et une valeur prédictive de 100% pour un titre de 1600 (Dupont et al., 1994). L'utilisation préférentielle de l'IFI au lieu de la CFT en médecine vétérinaire serait avantageuse pour le diagnostic et le contrôle de la fièvre Q au niveau animal (AFSSA., 2004). IFI est actuellement le test de référence en sérologie.

V.1.4 Test cutané :

Une méthode de test cutané a été proposée pour étudier la réponse cellulaire et améliorer la détection des vaches infectées au niveau du troupeau (Guatteo et al., 2008). Le test cutané consiste en une injection intradermique de vaccin inactivé extrêmement dilué (Coxevac, CEVA-Sante Animale, Libourne, France). Le vaccin dilué induit une réaction antigénique. Si l'animal a déjà été infecté par la fièvre Q, un nodule de taille variable apparaîtra au site d'injection. Ce test pourrait facilement être appliqué par les praticiens ruraux.

V.1.5 Les inconvénients des méthodes indirectes de diagnostic :

La dépendance des tests CFT, IFI et ELISA à la présence d'anticorps limite leur valeur diagnostique. En effet, les anticorps spécifiques sont souvent apparus après les 2 ou 3 premières semaines d'infection, rendant le diagnostic précoce par sérologie difficile, voire impossible (Kuroiwa et al., 2007). Dans la fièvre Q, les anticorps de phase II peuvent être détectés dans les deux semaines suivant l'infection et dans les trois semaines, 90% sont séropositifs. L'AFSSA (AFSSA., 2004) rapporte qu'un diagnostic définitif de cas humains par IFI ne peut être confirmé qu'un mois et demi après les premiers signes cliniques. L'immunité cellulaire nécessite également du temps avant de devenir détectable, mais l'utilisation de tests cutanés au niveau du troupeau évite que ce soit un problème, car différents stades d'infection sont présents simultanément dans le troupeau. Aucun de ces tests n'est capable de confirmer un diagnostic étiologique au niveau individuel. De plus, dans les infections aiguës, les facteurs rhumatismaux, les anticorps anti-mitochondriaux, les anticorps anti-nucléaires, les anticorps anti-muscles lisses, les anti-cardiolipines et les anticoagulants du lupus et d'autres auto-anticorps présentent souvent une augmentation marquée de leurs taux plasmatiques et peuvent interférer avec les tests de diagnostic (Vardi et al., 2011) Une prévalence élevée d'IgM contre le virus Epstein-Barr, le cytomégalovirus, le parvovirus, *Bordetella pertussis* et la pneumonie à *Mycoplasma* est également détectée. Vardi et al. (Vardi et al., 2011) ont conclu que le diagnostic ne devrait pas reposer sur une approche diagnostique unique. Le contexte clinique et épidémiologique global doit être pris en compte, de même que les limites des tests de diagnostic. Des analyses bactériologiques sont nécessaires pour confirmer ou infirmer tout soupçon de fièvre Q (Rousset et al., 2007).

V.2 Diagnostic direct :

Pour des examens de laboratoire spécifiques, il peut être nécessaire d'isoler l'agent. Les méthodes directes d'isolement et d'identification de l'agent infectieux nécessitent des échantillons appropriés, principalement représentés par le placenta, la muqueuse vaginale, le lait, le colostrum, les selles et les tissus du fœtus avorté, tels que le foie, les poumons et le contenu de l'estomac après l'avortement.

Plusieurs techniques sont disponibles pour l'identification de *C. burnetii* (OIE., 2010), même si elles se caractérisent souvent par une faible spécificité.

V.2.1 Isolement de l'agent :

Ces techniques ont été abandonnées en raison de leur niveau de risque élevé, même si elles peuvent être nécessaires lorsque l'isolement de *C. burnetii* est requis à partir d'échantillons contaminés par plus d'une espèce bactérienne (OIE., 2010). Lorsque *C. burnetii* est présent en grand nombre et est associé à un faible taux de contamination par d'autres bactéries, il est possible d'isoler directement par inoculation d'œufs de poule embryonnés ou par culture cellulaire (Maurin et Raoult., 1999; Samuel et Hendrix., 2009). Un système de micro-culture cellulaire issu d'une méthode disponible dans le commerce et utilisée pour la culture de virus, la culture de cellules de flacons en coquille, a été adapté pour isoler des bactéries intracellulaires strictes ou facultatives, y compris *C. burnetii*. Une telle méthode a été décrite pour *C. burnetii* en 1990 (Raoult et al., 1990). Des suspensions d'échantillons sont ensemencées dans une lignée cellulaire pour observer les vacuoles caractéristiques de la multiplication de *C. burnetii*. Cette méthode a été développée pour l'homme mais pourrait être adaptée pour les animaux. Avec des échantillons fortement contaminés, tels que placentas, sécrétions vaginales, selles ou lait, l'inoculation d'animaux de laboratoire peut s'avérer nécessaire en tant que système de filtration. Les souris et les cobayes sont les animaux les plus appropriés à cette fin (Scott et al., 1987).

V.2.2 Techniques de coloration :

Ces techniques peuvent être appliquées en cas d'avortements suspectés d'être d'origine infectieuse. Les meilleurs résultats peuvent être obtenus avec des frottis de cotylédon placentaire préparés sur des lames de microscope, mais le contenu des poumons, du foie et de l'abomas du fœtus avorté ou des pertes vaginales peuvent également être utilisés. Plusieurs méthodes conviennent à l'identification de *Coxiella* : Stamp, Gimenez, Macchiavello, Giemsa et Koster modifié (Gimenez., 1964; Quinn et al., 1994; Samuel et Hendrix., 2009). Les trois premières techniques donnent les meilleurs résultats (OIE., 2010). Ces méthodes sont proches de la méthode de Ziehl – Neelsen modifiée faisant appel à la fuchsine basique pour la coloration des bactéries. La méthode Stamp est préférée dans les laboratoires vétérinaires alors que la méthode Gimenez est très rapide pour surveiller les cellules de culture infectées dans les laboratoires de recherche. Il faut être prudent dans l'interprétation des résultats car, au microscope, *C. burnetii* peut être confondu avec *Chlamydomphila abortus* ou *Brucella spp.* Lorsque la coloration

biologique n'est pas concluante, l'une des autres méthodes peut être utilisée comme test de confirmation.

V.2.3 Méthodes de géotypage :

La détection, l'isolement et l'identification de *C. burnetii* peuvent être complétés par une caractérisation moléculaire, utile pour les études épidémiologiques. Plusieurs méthodes de typage ont été utilisées pour la caractérisation des souches de *C. burnetii*, telles que l'endonucléase de restriction de l'ADN génomique (Hendrix et al., 1991), le PFGE (électrophorèse en gel sur champ pulsé) (Jäger et al., 1998) et la séquence. et / ou analyse PCR-RFLP (polymorphisme de longueur de fragment de restriction) de gènes *icd*, *com1* et *mucZ*. Plus récemment, les deux méthodes de typage basées sur la PCR, MLVA (analyse du nombre variable de répétitions en tandem Multi Locus Variable) (Arricau-Bouvery et al., 2006; Svraka et al., 2006) et le typage de séquences multispacer (MST) (Glazunova et al., 2006). Gagnent en importance pour plusieurs raisons. En effet, ils permettent le typage de *C. burnetii* sans qu'il soit nécessaire d'isoler l'organisme. En outre, ils présentent un pouvoir discriminant élevé avec des coûts relativement bas. L'analyse MLVA est actuellement la méthode de référence pour la caractérisation génétique d'agents pathogènes importants tels que *M. tuberculosis*, *B. anthracis* et *Y. pestis*. Des études récentes ont montré que l'application de cette technique aux isolats de *C. burnetii*, tant d'origine animale qu'humaine, avait permis d'identifier 36 profils génétiques différents sur un total de 42 isolats (Arricau-Bouvery et al., 2006). De plus, des bases de données ont été établies, <http://minisatellites.u-psud.fr/MLVANet/> et <http://ifr48.timone.univmrs.fr> pour MLVA et MST, respectivement. La disponibilité de telles bases de données permet facilement les comparaisons entre laboratoires, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre la propagation des isolats de *C. burnetii*.

Ces outils sont très utiles pour les enquêtes épidémiologiques, en particulier pour clarifier les liens concernant les sources d'infection, pour mieux comprendre les facteurs épidémiologiques émergents et, dans une moindre mesure, pour évaluer les mesures de contrôle.

V.2.4 Méthodes de détection spécifiques :

La détection de *C. burnetii* dans des échantillons peut également être réalisée par immuno-détection spécifique (ELISA de capture, immunohistochimie), hybridation in situ ou amplification d'ADN (Jensen et al., 2007; Samuel et Hendrix, 2009; Thiele et al., 1992).

L'immuno-histologie peut être utilisée avec des tissus inclus en paraffine ou sur des frottis fixés à l'acétone (Raoult et al., 1994). Le procédé consiste en un dosage d'immunofluorescence indirecte ou d'immuno-péroxydase utilisant des anticorps polyclonaux spécifiques de *C. burnetii*. L'hybridation in situ fluorescente à l'aide de sondes oligon-ucléotidiques spécifiques ciblant l'ARNr 16s peut être utilisée sur des tissus inclus en paraffine, notamment des échantillons de placenta (Jensen et al., 2007).

La détection de *C. burnetii* est aujourd'hui principalement réalisée par PCR. Cette méthode présente de nombreux avantages car elle est hautement spécifique et sensible, elle permet l'inactivation du microorganisme par chauffage à 90 ° C pendant 30 à 60 min, elle permet de travailler sur différents types d'échantillons sans avoir à isoler la bactérie. Malheureusement, cette méthode ne permet pas l'isolement de l'agent. Les séquences cibles de la PCR sont nombreuses et la plus utilisée est la norme IS1111 (numéro d'accès M80806), ce qui la rend encore plus sensible, car cette séquence d'insertion est largement répétée dans le génome de *Coxiella*. La PCR est donc une méthode efficace pour identifier les animaux en train de perdre leur sang. Récemment, un protocole de PCR en temps réel a été mis en place pour l'identification et la quantification du nombre de bactéries présentes dans une matrice biologique. La quantification de *C. burnetii* dans les produits d'avortement est une information extrêmement importante, car elle est au cœur d'un diagnostic correct de cet agent pathogène en tant que cause réelle de l'avortement (Sidi-Boumedine et al., 2010)

VI. Traitement :

Les mesures thérapeutiques et préventives chez les petits ruminants visent à réduire les taux d'avortement et l'excrétion de bactéries, en visant à réduire la contamination de l'environnement. Des mesures de précaution spécifiques doivent être prises lorsqu'un animal est introduit dans une ferme indemne de *C. burnetii* afin de prévenir l'introduction d'une infection (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005). L'Autorité européenne de sécurité des aliments (2010) a publié récemment un document détaillé sur le contrôle de la fièvre Q qui décrit en détail toutes les étapes et actions nécessaires à un contrôle efficace de la maladie. Il est difficile de déterminer la sensibilité de *C. burnetii* aux antibiotiques, car il s'agit d'un organisme intracellulaire obligatoire. Dans les cas suspects d'avortement de *C. burnetii* chez les petits ruminants, un traitement antibiotique avec deux injections successives d'oxytétracycline (dose : 20 mg/ 10 kg

poids corporel) au cours du dernier mois de la grossesse a été recommandé (Berri et al., 2002 ; Arricau -Bouvery et Rodolakis, 2005 ; Angelakis et Raoult, 2010), bien que chez les ovins, aucun effet bénéfique du traitement antibiotique n'ait été enregistré sur le niveau ou la durée de l'excrétion bactérienne. Néanmoins, le taux d'avortement a diminué dans la même étude (Astobiza et al., 2013). Wouda et Dercksen (2007) ont exprimé des doutes sur la possibilité que les antibiotiques réduisent les taux d'avortement dans les troupeaux de chèvres aux Pays-Bas. Berri et al. (2005) ont suggéré que le traitement antibiotique avait eu un effet à long terme chez les moutons au niveau du troupeau, en empêchant la propagation de l'organisme aux animaux non affectés du même troupeau, hypothèse qui n'a pu être confirmée par des études ultérieures (Astobiza et al., 2013).

La prévention de l'avortement et de l'excrétion chez les petits ruminants peut être mieux établie par la vaccination. Les vaccins contre la fièvre Q varient en ce qui concerne les processus de préparation de la souche de l'organisme qu'ils contiennent. Les vaccins les plus efficaces sont composés de *C. burnetii* en phase I (Arricau-Bouvery et al., 2005). Les vaccins actuellement disponibles prétendent prévenir l'avortement et contribuer à la réduction de l'excrétion des charges vaginales, des matières fécales et du lait. La vaccination semble être plus efficace lorsqu'elle est administrée à de petits ruminants non infectés avant leur première grossesse (Hogerwerf et al., 2011 ; Van den Brom et al., 2013b). Conformément à la situation chez les vaches (Guatteo et al., 2008), la vaccination des petits ruminants naturellement infectés n'arrête pas l'avortement, l'excrétion se poursuit souvent, probablement à cause d'une infection persistante de la glande mammaire et de l'utérus (Arricau-Bouvery et Rodolakis., 2005; Stuen et Londubat., 2011).

VII. Méthodes de contrôle et vaccination :

VII.1 Méthodes de contrôle :

En cas d'épidémie de fièvre Q, des mesures sanitaires et prophylactiques doivent être appliquées au niveau du troupeau et au niveau humain afin de limiter la transmission de la maladie. Les infections humaines et animales doivent être diagnostiquées précocement et traitées immédiatement pour prévenir le développement d'infections chroniques et de

complications secondaires. La fièvre Q étant une zoonose, la prophylaxie au niveau du troupeau est fondamentale.

L'identification d'un antibiotique capable de diminuer sévèrement ou d'arrêter complètement l'excrétion modifierait radicalement la gestion de l'infection à *Coxiella* au niveau du troupeau. Actuellement, le traitement antibiotique n'arrête pas l'excrétion (Woernle et al., 1985 ; Astobiza et al., 2010). Il pourrait également s'avérer utile de prévenir l'infection des femelles enceintes en empêchant la perte de bactéries par les chiens et les chats domestiques.

La pasteurisation de tous les produits laitiers doit être effectuée si l'ingestion s'avère une voie d'infection efficace et après détermination de la dose minimale infectante de bactéries. Dans l'attente de nouvelles recherches scientifiques, la prudence est recommandée, en particulier pour les personnes présentant un risque élevé d'infection chronique.

VII.2 Vaccination :

Rodokalis et al. (Rodolakis et al., 2007) ont suggéré un suivi des troupeaux de bovins et de caprins par analyse de lait de citerne BTM (Bulk Tank Milk). Dans les troupeaux présentant un résultat de BTM positif à la PCR, des pools de 10 échantillons de lait individuels doivent être testés par PCR pour identifier les animaux excréteurs. Si ces dernières ne sont pas très nombreuses, ils peuvent être éliminés et les autres animaux doivent être vaccinés. Rodokalis et al. (Rodolakis et al., 2007) ont également suggéré la vaccination des troupeaux à proximité de troupeaux infectés. Chez les animaux, les vaccins considérés comme les plus efficaces sont composés de bactéries entières de phase 1 inactivées (OIE., 2005). En effet, chez les chèvres, le vaccin inactivé de phase I (Coxevac, CEVA Santé Animale, Libourne, France) protège efficacement contre l'avortement et il a été prouvé qu'il empêchait l'excrétion de bactéries dans le mucus vaginal, les selles et en particulier dans le lait. Cependant, la vaccination s'est avérée plus efficace chez les animaux nullipares que chez les animaux ayant vêlé. De plus, la vaccination n'a pas éliminé l'infection chez les caprins précédemment infectés (Arricau-Bouvery et al., 2005 ; Hogerwerf et al., 2001 ; Rousset et al., 2009) et les bovins (Guatteo et al., 2008).

L'étude de Guatteo et al. (Guatteo et al., 2008) sur des bovins laitiers ont rapporté que la probabilité de devenir un excréteur chez les bovidés vaccinés naïfs non gestants était cinq fois inférieure à la probabilité que les bovidés naïfs reçoivent un placebo. Cependant, la vaccination n'a eu aucun effet sur la charge bactérienne excrétée. Vaccination d'animaux préalablement infectés et d'animaux naïfs pendant la grossesse s'est avérée inefficace. Guatteo et al. (Guatteo

et al., 2008) ont émis l'hypothèse que l'immunodépression induite par la grossesse était responsable de l'absence de réponse immunitaire efficace après la vaccination. Cette explication semble plausible, mais une seconde étude est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. Aucun effet indésirable n'a été observé au site d'injection dans cette étude. Un avortement a été signalé chez une vache infectée vaccinée, mais aucune autre enquête n'a été menée sur cet animal, à l'exception d'une PCR sur le mucus vaginal au moment de l'avortement qui a donné un résultat négatif.

Le problème majeur associé à la vaccination avec le vaccin de phase 1 inactivé est l'impossibilité de distinguer les animaux vaccinés des animaux naturellement infectés par les méthodes ELISA. Au niveau du troupeau, l'efficacité d'un programme de vaccination pourrait être évaluée en surveillant l'excrétion de bactéries dans le BTM. Actuellement, la prophylaxie inclut la vaccination avec Coxevac (CEVA-Santé Animale, Libourne, France), le vaccin inactivé de phase I inactivé non officiellement autorisé, lorsqu'un foyer de fièvre Q est déclaré. Ce vaccin contient *Coxiella burnetii* inactivée au formol (souche RSA 493 / Nine Mile phase I) (CEVA., 2010). Une étude récente de Hermans et al. (Hermans et al., 2011) ont signalé la présence d'ADN bactérien provenant du vaccin Coxevax dans du lait de chèvre après inoculation. L'ADN de *Coxiella burnetii* était détectable jusqu'à 9 jours après la vaccination en quantités estimées par PCR jusqu'à environ 100 équivalents de génome par ml.

La quantité d'ADN détectée dans leur étude était proche du niveau de détection. Après le rappel, la durée de l'excrétion de l'ADN dérivé du virus vacciné était plus courte, quantitativement inférieure et détectable chez moins d'animaux qu'après la première inoculation. Cette constatation a induit la modification de la stratégie de contrôle néerlandaise. En effet, après l'épidémie, il était nécessaire de tester la BTM par PCR dans des fermes laitières comptant au moins 50 ovins ou caprins toutes les deux semaines et de vacciner toutes les chèvres laitières et ovines avec Coxevac. Après cette étude, un intervalle de deux semaines entre la vaccination et le test de BTM a été imposé (Hermans et al., 2011). L'étude de De Cremoux et al. (Cremoux et al., 2011) ont montré que la vaccination des troupeaux de chèvres infectés diminuait les signes cliniques et l'excrétion vaginale globale, la vaccination étant particulièrement efficace chez les jeunes animaux sensibles. En outre, la durée de la protection vaccinale n'a pas été pleinement étudiée. De nouveaux vaccins, tels que les vaccins recombinants, ont été développés (Zhang et

al., 2003). Plusieurs de ces vaccins se sont révélés antigéniques mais non protecteurs. D'autres nécessitent encore une étude de leur efficacité sur le terrain (Waag et al., 2007). Un vaccin de phase II inactivé, Chlamyvac FQ, a également été testé sur des animaux mais n'a pas été efficace (Arricau-Bouvery et al., 2005).

Deuxième partie :
PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I :

*Etude de la séroprévalence de
la fièvre Q dans la région de
SIDI BELABBES*

I. Objectifs de l'étude :

Cette partie de notre travail constitue une étude préliminaire visant à estimer la séroprévalence de la fièvre Q chez les ovins avortés dans la région d'étude. Entre autre, les factures épidémiologiques encourageant la séropositivité des animaux ont été également évaluées.

II. Présentation de la zone d'étude :

Cette étude a été conduite dans la wilaya de Sidi Bel-Abbès. Cette wilaya se situe au Nord-Ouest de l'Algérie à environ 430 km du capital d'Alger. Elle s'étend sur une superficie de 9 150 km² (Figure 1). Elle est subdivisée en 52 communes affiliées à 15 Daïras. La wilaya de Sidi Bel-Abbès est subdivisée en trois zones, une zone montagneuse au nord et dans la partie centrale de la wilaya, une zone des plaines représentées par la plaine de Sidi Bel Abbès au centre et les hautes plaines de Telagh vers le sud-est de la wilaya, et les zones steppique au sud.

Dans la wilaya de Sidi Bel-Abbès la vocation agricole domine au nord soit au niveau des plaines et sur les bas piémonts, et une vocation sylvo-pastorale sur les hautes plaines steppiques du sud. Cette wilaya se dispose d'un potentiel de ressources animales très diversifiées, la région nord se caractérise par la prédominance des élevages bovin et aviaire et la région sud caractérisée par des élevages ovins et caprins.

La région de Sidi Bel Abbès est caractérisée par un climat méditerranéen et elle appartient à l'étage bioclimatique semi-aride à tendance continentale : hiver humide et froid, été sec et chaud, saisons intermédiaires courtes (Bennabi et al., 2012).



Figure 6: Présentation de la wilaya de Sidi Belabbès dans l'Algérie (BENNABI et al, 2012)

III. Echantillonnage et critères d'inclusion :

L'étude a été menée dans 39 élevages ovins situant dans différentes régions de la wilaya de Sidi Bel-Abbès. Les critères d'inclusions pour la réalisation des prélèvements sanguins sont la déclaration d'un cas d'avortement et l'appartenance de l'élevage à la région d'étude.

Afin de mettre le point sur les principaux facteurs de risques influençant l'apparition des cas d'avortement chez les brebis dans la région concernée par cette étude, des informations relatives à l'élevage ont été collectées à l'aide d'un questionnaire (Annexe 01), ces informations portent généralement sur les données zootechniques des élevages ainsi que le statut sanitaire des ovins, les principaux renseignements recueillies sont les suivantes :

- Le domaine de la production (viande/lait).
- Le nombre total d'animaux à la ferme.

- Le nombre et l'âge d'animaux avortés.
- Le stade d'avortement
- Les mesures de biosécurité à la ferme.
- Données zootechniques de l'élevage

Les questionnaires ont été remplis en présence des éleveurs qui ont donné son accord et collaborent à l'étude. Pour avoir plus de fiabilité et crédibilité des réponses aux questions, ces éleveurs ont reçu des informations relatives à l'objectif et l'intérêt de l'étude, en plus des observations sur site en été faites pour évaluer l'état sanitaire des animaux et les conditions d'hygiène et propreté de l'élevage.

IV. Réalisation des prélèvements

Au total, 180 prélèvements ont été réalisés (39 élevages). Sur tubes secs stériles de type Vacutainer, à l'aide d'aiguilles jetables, des échantillons de sang (environ 4 ml) ont été prélevés à la veine jugulaire des brebis ayant avorté. Les brebis faites l'objet de prélèvement sont âgées de 1 à 6 ans provenant de six Daïras situées dans le sud de la wilaya de Sidi Bel Abbès (Telagh, Merine, Marhoume, Moulay Slissen, Ras El-Ma et Tanira).

Les échantillons de sang prélevés ont été mis au froid (4°C) dans une glacière et acheminés le jour même au laboratoire. Les tubes ont été soumis à la centrifugation à 3000 x g pendant 5 minute pour récupérer les sérums, ces derniers transvasés dans des tubes Eppendorf et conservés à -20°C pour la réalisation des tests sérologiques.

Pour chaque animal prélevé, une fiche signalétique d'accompagnement portant toutes les renseignements nécessaires ont été établie. En parallèle, un questionnaire a été rempli portant les données de l'élevage ainsi que les circonstances de l'avortement de l'animal ou les animaux dans la ferme.

V. Analyses sérologiques :

La réalisation des analyses sérologiques des 180 sérums récoltés à lieu dans le laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen « LVRT » suivant les instructions préconisées par le fabricant du kit sérologique.

V.1 Matériels d'analyses :

- Centrifugeuse : capable de tourner à au moins 2500 tours/ min ;
- Etuve : réglé à 37 °C pour l'incubation des microplaques
- Micropipettes de différents volumes
- Plaques de microtitration « qualité ELISA » puits à fond plat

V.2 Description et principe :

Les anticorps dirigés contre *Coxiella burnetii* ont été révélée à l'aide du kit LSIVET Ruminant Milk/Serum Q Fever (LSI, France). Les étapes de réalisation du test Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) indirecte ont suit les instructions du fabricant.

Dans le kit de détection, les cupules sont sensibilisées avec de l'extrait antigénique spécifique de *Coxiella burnetii* phase I et II. Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les cupules. Les anticorps spécifiques de *Coxiella burnetii*, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps. Après lavage, un conjugué anti-multi-espèces marqué à la peroxydase (HRP) est distribué dans les cupules. Il se fixe aux anticorps, formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-HRP. Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB).

La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans le sérum à tester : en présence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage, en l'absence d'anticorps dans l'échantillon il n'apparaît pas de coloration. La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.

V.3 Mode opératoire pour Kit *Coxiella burnetii* :

Ramener tous les réactifs à température ambiante ($21\text{ °C} \pm 5\text{°C}$) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

- Distribuer 90 µl de Tampon de dilution 2 dans chaque puits
- Distribuer :
 - ✓ 10 µl de Contrôle Négatif dans les cupules A1 et B1.
 - ✓ 10 µl de Contrôle Positif dans les cupules C1 et D1.
 - ✓ 10 µl de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes.

- Incuber 45 min \pm 4 min à 21°C (\pm 5°C).
- Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 μ l de Solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
- Préparer le Conjugué 1X en diluant le Conjugué 10x au 1/10^{ème} en Tampon de dilution 3.
- Distribuer 100 μ l de Conjugué 1X dans chaque cupule.
- Incuber 30 min \pm 3 min à 21°C (\pm 5°C).
- Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 μ l de Solution de lavage.
- Distribuer 100 μ l de Solution de révélation dans chaque cupule.
- Incuber 15 min \pm 2 min à 21 °C (\pm 5°C) à l'obscurité.
- Distribuer 100 μ l de Solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
- Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

V.4 Réalisation du test :

V.4.1 Préparation des échantillons :

Les réactifs et les prélèvements ont été portés à température ambiante (21 \pm 5°C) avant la réalisation du test (Figure 7).

Pour réduire la différence des temps d'incubation entre les échantillons, il est possible de préparer une microplaque de 96 puits contenant les échantillons à tester et les échantillons de contrôle, puis de les transférer dans la plaque ELISA avec une pipette multicanaux.



Figure 7: Réactifs et échantillons à tester mes à température ambiante avant la réalisation du test.

- Distribution de 90 μ l de Tampon de dilution 2 dans chaque puits (Figure 8).
- Puis la distribution de 10 μ l de Contrôle Positif dans les cupules A1 et B1,
- Ensuite distribution de 10 μ l de Contrôle Négatif dans les cupules A2 et B2
- Enfin distribution de 10 μ l de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes

Après l'Homogénéisation par agitation douce manuelle ou à l'aide d'un agitateur de plaque

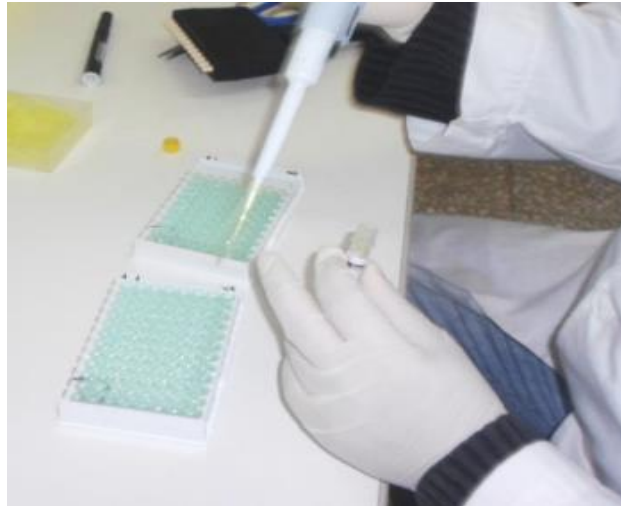


Figure 8: Distribution de tampon, contrôle négatif, contrôle positif et les échantillons à tester.

V.4.2 Incubation :

Incuber 45 min \pm 4 min à 21°C (\pm 5°C) (Figure 9).



Figure 9: Incubation des microplaques.

V.4.3 Lavage :

- Préparation solution de lavage :

La préparation de la solution de lavage (1X) a été fait par dilution au 1/20^{ème} de la solution de lavage (20X) dans de l'eau distillée/désionisée puis les lavages ont été réalisés manuellement sous un volume de 300 μ L par cupule.

-Préparation du conjugué :

La préparation de la solution de conjugué a été fait par dilution du conjugué concentré 10 fois dans le diluant du conjugué (10 ml est nécessaire par plaque, soit 1 ml de conjugué concentré dilué dans 9 ml de diluant du conjugué). Après préparation de solution de conjugué on distribuer 100 μ l de solution dans chaque cupule avant de refaire une deuxième incubation 30 min \pm 3 min à 21°C (\pm 5°C). Suivie d'un lavage terminal de la plaque.

V.4.4 Révélation :

Ajout du substrat :

Distribuer 100 μ l de solution de révélation dans chaque cupule homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque et on refaire cette fois la dernière incubation pendant 15 min \pm 2 min à 21 °C (\pm 5°C) à l'obscurité.

Ajout de la solution d'arrêt :

Distribuer 100 μ l de Solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction et homogénéiser en tapotant légèrement la plaque à la main ou à l'aide d'un agitateur de plaque (Figure 10).

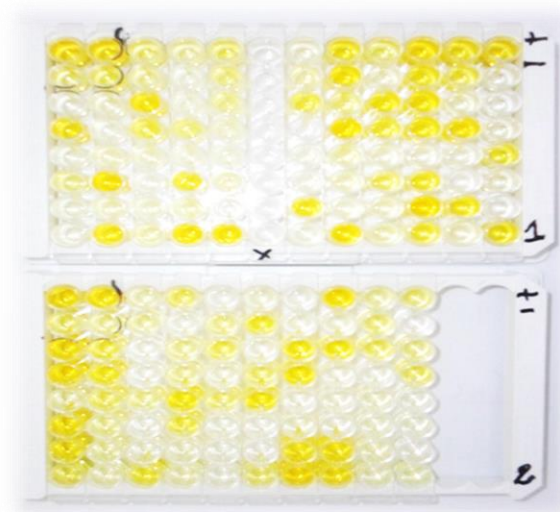


Figure 10: Incubation des microplaques.

V.4.5 Lecture

La mesure des densités optiques (DO) des échantillons a été faite à 450nm suivi d'un enregistrement des résultats.

- Validation et interprétation des résultats :

Le test ELISA a été d'abord validé pour les deux plaques selon les consignes du fabricant grâce aux formules ci-dessous :

Validation du test de « fièvre Q »*Tableau 1: Validation du test ELISA*

	Densité optique de contrôles positifs	Densité optique de contrôles négatifs
Plaque 1	DO _{cp} 1 : 2,137	DO _{cn} 1 : 0,528
	DO _{cp} 2 : 2,118	DO _{cn} 2 : 0,712
Plaque 2	DO _{cp} 1 : 2,218	DO _{cp} 1 : 0,552
	DO _{cp} 2 : 1,854	DO _{cp} 2 : 0,404

Validation de la plaque 1 : la première plaque a été validée comme suit :

La valeur moyenne de densité optique des contrôles positifs :

$$DO_{mcp} = 2.137 + 2.118 / 2 = 2.127 \text{ par conséquent } 2.127 > 0.35$$

La valeur moyenne de densité optique des contrôles négatifs :

$$DO_{mcn} = 0,528 + 0,612 / 2 = 0.57$$

Le rapport entre la moyenne des contrôles positifs (DO_{cp}) et la moyenne des contrôles négatifs (DO_{cn}) : DO_{cp}/DO_{cn} (2.127/0.57=3,713) par conséquent 3.713 > 3

Validation de la plaque 2 : la deuxième plaque a été validée comme suit :

La valeur moyenne de densité optique des contrôles positifs :

$$DO_{mcp} = (2.218 + 1.854) / 2 = 2.036 \text{ par conséquent } 2.036 > 0.35$$

La valeur moyenne de densité optique des contrôles négatifs :

$$DO_{mcn} = 0.552 + 0.404 / 2 = 0.478$$

Le rapport entre la moyenne des contrôles positifs (DO_{cp}) et la moyenne des contrôles négatifs (DO_{cn}) : DO_{cp}/DO_{cn} (2.036/0.478=4.259) par conséquent 4.259 > 3

- Interprétation des résultats :

Pour chaque échantillon le pourcentage suivant a été calculé

$$S/P: S/P\% = DO_{\text{échantillon}} / DO_{\text{control positive}} \times 100$$

Tableau 2: Interprétation des résultats.

Résultat	Statut
S/P% <40%	Négatif
40% < S/P < 50%	Douteux
S/P% > 50%	Positif

Puis le ratio S/P (échantillon/positif) a été calculé pour chaque échantillon testé puis converti en titre d'anticorps. Des titres inférieurs à 40 sont considérés comme négatifs alors que les titres supérieurs à 50% sont considérés positifs.

VI. Analyses Statistiques :

Le test de Fisher exact (IBM-SPSS Statistics 23) a été utilisé pour comparer la séroprévalence chez les animaux appartenant aux différentes catégories d'âge et provenant des différentes régions de la zone d'étude. Les résultats des différences ont été jugés significatives si la probabilité trouvée est inférieure au seuil de 0.05 ($P < 0.05$).

VII. Résultats :

VII.1 Séroprévalence totale :

Les résultats de la recherche des anticorps dirigés contre *C. burnetii* réalisé sur des sérums de brebis ayant un historique d'avortement sont présentés dans le tableau 03. Sur un total de 180 sérums testé, 50 sérums sont révélés positives et 130 ont donné des résultats négatifs, qui se traduit par une séroprévalence individuelle de la fièvre Q dans la zone d'étude de 27,8 % avec un intervalle de confiance à 95 % est de 21,5% à 35%. Autre, sur les 39 élevages étudiés, des sérums positifs ont été trouvés dans 28 élevages par rapport 11 où aucun cas positif n'a été détecté, cela donne un taux de séroprévalence troupeau de la fièvre Q dans la zone d'étude de 71,8 % avec un intervalle de confiance à 95 % est de 55 % à 85 %.

Tableau 3: La séroprévalence de la Fièvre Q chez les ovins dans la wilaya de Sidi Bel Abbas.

	Séropositifs	Total
Nombre d'animaux	50	180
Séroprévalence individuelle	27,8% [21,5 -35]	
Nombre de troupeaux	28	39
Séroprévalence Troupeau	71,8% [55-85]	

VII.2 Séroprévalence en fonction de la taille du troupeau :

Cette étude a révélé que la séroprévalence troupeau est de 91 % pour les troupeaux à effectifs importants (>200), alors qu'elle est de 68 % pour les troupeaux de taille moyenne (entre 100 et 200 têtes), contre 50% pour les troupeaux de petite taille (<100). La taille des troupeaux n'a pas un effet significatif sur la séroprévalence de la fièvre ($p= 0,07$ et ceci $> 0,05$).

Tableau 4: Séroprévalence de la fièvre Q en fonction de la taille du troupeau.

Taille du troupeau	Nombre de troupeaux	Nombre de troupeaux positifs	Prévalence troupeau (%)
<100	6	3	50%
[100-200]	22	15	68%
>200	11	10	91%
Total	39	28	71,8%

VII.3 Séroprévalence individuelle de la Fièvre Q par rapport l'âge des brebis :

La séroprévalence de la fièvre de Q par rapport l'âge des brebis sont présentées dans le tableau 05. On observe que les animaux jeunes (âge moins de 3 ans) ont présenté le taux d'avortement avec séropositivité le plus élevé (28,7%), suivie par les animaux âgés de 5 ans (27,8%). Les animaux dans les autres catégories d'âge ont donné des taux de séropositivité faible. La différence statistique en fonction de l'âge est non significative. ($p=0,8$)

Tableau 5: Séroprévalence individuelle de la Fièvre Q par rapport l'âge des brebis.

Catégories d'âge	Nombre d'animaux prélevés	Nombre d'animaux positifs	Séroprévalence
<3ans	122	35	28,7%
4 ans	14	3	21,5%
5 ans	36	10	27,8%
6 ans	8	2	25%
Total	180	50	27,8%

VII.4 Séroprévalence de la Fièvre Q en fonction du stade d'avortement :

Les résultats de la répartition des taux de séroprévalence de la Fièvre Q dans la wilaya de Sidi Bel-Abbès par rapport au stade d'avortement montrent que le taux de séropositivité est élevé chez les animaux avortés en phase de gestation avancée en 3^{ème} tiers (38,3%). Ce taux est aussi important pour les animaux avortés en deuxième tiers de gestation (28,6%) (Tableau 06).

Tableau 6: Séroprévalence individuelle de la Fièvre Q en fonction du stade d'avortement

	Nombre de brebis prélevées	Nombre de brebis positives	Séroprévalence
1 ^{ère} tiers	42	6	14,3%
2 ^{ème} tiers	91	26	28,6%
3 ^{ème} tiers	47	18	38,3%
Total	180	50	27,8%

VII.5 Séroprévalence de la fièvre Q dans les différentes Daïra :

Les résultats présentés dans le tableau 00 montrent une distribution homogène des taux de séroprévalence de la fièvre Q dans les différentes Dairas de la zone d'étude, sauf pour la Daïra de Tanira où le taux de séroprévalence était élevé (50%).

Tableau 7: La séroprévalence de la fièvre Q en fonction des différentes Daïras.

Daïra	Nombre de brebis	Nombre de brebis séropositives	Séroprévalence
Telagh	30	7	23,23%
Ras Elma	30	7	23,23%
Tanira	34	17	50%
M'slissen	40	8	20%
Merine	27	8	29,63%
Marhoum	19	3	15,79%
Total	180	50	27,78%

VIII. Discussion :

En Algérie, la fièvre Q comme maladie émergente est peu étudiée ainsi que les facteurs de risques entourant cette infection ne sont pas clairement élucidés que soit en médecine humaine ou vétérinaire, car les outils de diagnostic ne sont pas facilement mis à disposition pour les professionnels de santé et les épidémiologistes.

En conséquence, aucune image précise de cette maladie ni de sa prévalence ni disponibles sur toutes les régions de l'Algérie. Néanmoins, historiquement, les premiers cas de la fièvre Q ont été signalés à Alger en 1948 par Portier et al (Portier et al., 1948), quelques années après, des épidémies ont été rapportés à Batna (dans l'armée française en 1955 et en 1957) et à Tlemcen (également dans l'armée) (Rey et al., 2000). La survenue de cette maladie chez l'homme est étroitement liée aux plusieurs facteurs prédisposant et favorisant, dont le contact avec les ruminants domestiques a été considéré comme l'un des facteurs de risque les plus importants de l'infection à *C. burnetii*.

Chez les ruminants, *C. burnetii* est répandu dans les troupeaux de moutons (Yahaoui et al., 2013; khaled et al., 2016) et est connu pour être un agent important de l'avortement chez les ovins engendrant des pertes économiques importantes pour les éleveurs (Oporto et al., 2006). Malgré cela, il existe très peu d'informations sur l'état actuel de cet agent pathogène chez ruminants dans l'ouest Algérien comme la wilaya de Sidi Bel-Abbès.

Le présent travail est considéré comme une première approche pour améliorer et actualiser les connaissances sur la situation actuelle de *C. burnetii* chez les animaux d'élevage de la région Nord-ouest de l'Algérie, nous avons étudié la séroprévalence chez les ovins élevés dans des conditions extensives et semi-extensives dans la wilaya de Sidi Bel-Abbès.

Dans cette étude, la séroprévalence individuelle de la fièvre Q était de 27,7%, et la séroprévalence troupeaux était 71,8%, ces résultats montrent que l'infection à *C. burnetii* est dispersée dans presque toute la région d'étude. Nos résultats sont comparables à ceux rapportés dans d'autres régions de l'Algérie. Pour la prévalence individuelle, nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par Rahal et al. (2011) et Khaled et al. 2016 [18% et 12,2%, respectivement] ; mais très proche de celui de Yahiaoui et al. (2013) [26%]. Considérant la séroprévalence troupeaux, nos résultats sont en accordance avec les auteurs cités en dessus, qui ont trouvés des prévalences comprises entre 70% à 75%.

Des études ont aussi rapporté la présence de la *C. burnetii* chez le cheptel ovin dans certaines régions méditerranéennes, Masala et al., (2004), Loukaides et al., (2006) et Kennerman et al., (2010) ont trouvés des prévalences individuelles de l'ordre de 10% ; 25,3% et 20%, respectivement en Italie, Chypre et la Turquie.

La séroprévalence élevée observée dans la présente étude chez les ovins pourrait s'expliquer par différents facteurs, ainsi la distribution spatiale de la maladie dans toute la région pourrait être liés aux conditions de gestion des élevages dans lesquelles les animaux se déplacent pendant toute l'année sur de grandes surfaces augmentant ainsi le contact avec d'autres animaux. Ajoutant que la fièvre Q est une maladie vectorielle liée aux activités des tiques, le système de production local et des facteurs de gestion pourraient influencer le cycle de vie de *C. burnetii*. De plus, la faune pourrait jouer un rôle important en tant que réservoir pour le bétail (Ruiz-Fons et al., 2008), en particulier lorsque les systèmes de production extensifs sont prédominants, ce qui augmente le risque de contact faune / faune.

Dans cette étude, selon la taille des troupeaux, l'analyse statistique ne décèle aucune différence significative. En effet, l'enquête a révélé que la prévalence troupeau est de 50% pour les troupeaux de petite taille (<100 têtes), de 68,2% pour les troupeaux de taille moyenne (entre 100 et 200 têtes) et de 90,9 % pour les troupeaux d'effectif important (>200 têtes). Les troupeaux de grande taille sont donc plus infectés que les troupeaux de moyenne et petite taille. En effet, l'étude de Georgiou, 2013 réalisée en Chypre, a montré une augmentation du taux d'avortement causés par la fièvre Q dans les exploitations agricoles de grande capacité : 8 fermes (8,4%) de petite capacité (1-50 animaux), 21 exploitations agricoles (22,1%) d'une capacité modérée (51 à 199 animaux) et 66 exploitations agricoles (69,5%) de grande capacité (> 200 animaux) (Georgiou, 2013). Deux autres études, celle de Yahiaoui (2013) et Kennerman et al. (2010) réalisées sur 20 et 42 troupeaux ovins successivement, ont démontré également une association entre la taille du troupeau et le taux d'infection de la fièvre Q (Yahiaoui, 2013 ; Kennerman et al., 2010).

En ce qui concerne l'effet de l'âge sur la séroprévalence *C. burnetii* chez les ovins avortés, l'enquête épidémiologique a montré que les animaux de jeune âge moins de trois ans ont présentés le taux d'avortement le plus élevé avec une séropositivité. Plus précisément 35

animaux sur 50 qui sont positifs à la fièvre Q avaient avortés à l'âge moins de 3 ans, et 12 animaux sur 50 sont positifs à la fièvre Q à l'âge plus de 5 ans.

Ces résultats correspondent à l'étude de Yahiaoui (2013), menée durant la saison d'agnelage 2011 dans la région de Ksar El-Boukhari sur 184 sujets repartis sur 20 troupeaux et l'étude de Kennerman et al. (2010), menée entre 2001-2004 sur 743 sujets repartis sur 42 troupeaux de trois provinces de Turquie, ces deux études ont démontré que *C.burnetii* circulait parmi la jeune population de moins de deux ans, et que cette catégorie est associée à un taux de séroprévalence plus élevé. Cela s'explique par la cinétique des anticorps qui chutent au bout d'un certain moment après l'exposition par conséquent les brebis les plus âgées expriment des scores d'anticorps moins élevés.

L'étude a révélé aussi un risque relatif de $RR = 2$ pour les brebis avortées dans le dernier tiers de gestation. On constate également que 38,3% (18/50) des brebis de cette catégorie sont fortement positives alors que seulement 14,3% (6/50) de celles qui ont avorté dans le premier tiers de gestation sont fortement positives. Le risque est donc deux fois plus élevé chez la catégorie des brebis ayant avortées dans le dernier tiers de gestation, qui sont également les plus souvent fortement positives. Cela correspond aux résultats de l'étude de Georgiou (2013), menée en Chypre qui a démontré que les avortements sont observés chez les brebis surtout au dernier tiers de gestation comparativement aux deux premiers tiers de gestation. Le stade d'avortement chez les brebis est lié aux pathogénies de la fièvre Q, en fait, après l'inoculation et passage du germe vers la sphère génitale exactement l'utérus et le placenta, la bactérie se multiplie dans les cotylédons, provoquant une inflammation ces derniers, et avec l'avancement de la gestation et l'augmentation du poids du fœtus, ses besoins en oxygène et nutriments augmentent. Dans le cas d'une infection à *C. burnetii*, le passage d'oxygène et les nutriments vers le fœtus est interrompue conduisant à la mort du fœtus et son expulsion quelque jours avant l'agnelage, il est observé aussi dans quelques cas que les brebis mettent bas à terme des agneaux mort-nés ou morts peu après leur naissance accompagnés d'un placenta nécrotique et enflammé (Martinov et al., 1989).

Concernant l'effet de la région sur la séroprévalence de la fièvre Q, notre étude a montré que la région ne peut avoir une influence capitale sur la séroprévalence et la propagation de la fièvre Q. Notre étude a été réalisée dans des Daïras représentatives de la wilaya de Sidi Bel-Abbes

situant au sud de la wilaya. Mais, selon les constatations recueillies lors de des visites et la réalisation des prélèvements, on a remarqué que presque les pratiques d'élevage sont appliqués, aussi le déplacement continue des animaux entre les différentes régions de la wilaya et même vers d'autres wilayas limitrophes peut avoir un effet sur la dissémination de la maladie dans tous les élevages. Aussi la transhumance et la vente des animaux dans les marchés de bestiaux peut contribuer certainement à la propagation de la maladie. Il est important de signaler que dans d'autres pays où les animaux sont bien identifiés et son déplacement est limité et contrôlé peut diminuer la dissémination de la maladie, où des zones sont trouvés infectées et d'autres zones sont indemnes (Kennerman et al., 2010).

Les résultats de la séroprévalence trouvées dans cette étude pourraient mettent en évidence le risque zoonotique à *C. burnetii*, où les éleveurs et les personnes en contact étroits avec les animaux sont les plus exposés à l'infection. En plus, le système de gestion des élevages contribue à la dissémination de la maladie, car d'autres animaux comme les bovins et les caprins se trouvent toujours en cohabitation avec les ovins.

Dans les pays méditerranéens, la séroprévalence de la fièvre Q chez les bovins et les chèvres suggère que ces espèces représenteraient également un risque potentiel. En fait, la séropositivité des bovins variait entre 5,8% et 25% (Cetinkaya et al., 2000; Psaroulaki et al., 2006) et chez les caprins entre 13% et 51% (Loukaides et al., 2006; Masala et al., 2006). En Algérie, les plus fortes prévalences observées chez ces espèces étaient de 19,1% (Rahal et al., 2018) chez les bovins et 32,7% chez les caprins (khaled et al., 2016) dans différents systèmes de production du centre et du sud de l'Algérie. D'autres facteurs de gestion, tels qu'un contact plus étroit entre les brebis pendant l'agnelage, ce qui implique un hébergement de nuit, pourraient expliquer la séroprévalence globale plus élevée chez les ovins que chez les bovins.

La comparaison des résultats de séroprévalence trouvées par la méthode ELISA rapportés ici avec d'autres enquêtes épidémiologiques doit être soigneusement examinée en raison des différentes techniques sérologiques utilisées. Tandis que des études récentes ont tendance à utiliser le test de fluorescence indirecte (IFA) ou ELISA, celles réalisées il y a quelques décennies utilisaient principalement le test de fixation de complément (CFT). Alors que les tests IFA et ELISA sur des sérums de ruminants ont donné des résultats similaires, un faible accord a été observé entre ELISA et CFT (Kováčová et al., 1998; Rousset et al., 2007). Bien que le

test ELISA puisse ne pas détecter le contact de *C. burnetii* à un niveau individuel (Rousset et al., 2007), il devient très utile pour les études au niveau de la population telles que celle présentée ici. Par ailleurs, les méthodes moléculaires sont des outils extrêmement sensibles pour détecter les animaux infectés par *C. burnetii*. Néanmoins, la grande variabilité de l'excrétion de *C. burnetii* par les animaux tout au long de l'année limite la fiabilité des méthodes moléculaires à des fins épidémiologiques, en particulier si l'échantillonnage a lieu en dehors de la saison de reproduction.

Chapitre II.

*Caractérisation moléculaire
de *Coxiella burnetii* par PCR
à partir des tiques provenant
des ruminants.*

I. Problématique et objectifs

La fièvre Q est une maladie zoonotique causée par une bactérie intracellulaire obligatoire *Coxiella burnetii* (Angelakis et Raoult, 2010). Les ruminants domestiques (bovins, ovins et caprins) sont les principaux réservoirs de ce bactérie (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005). Les tiques sont impliquées dans l'épidémiologie de *C. burnetii*, bien que pas comme des vecteurs principaux.

Des études réalisées auparavant sur les tiques et les maladies transmises par les tiques en Algérie ont signalés l'implication des tiques dans la transmission de la maladie, ces études sont limités plupart d'entre elles concernent le région nord-est de l'Algérie (Bitam et al., 2006; Leulmi et al., 2016; Aouadi et al., 2017). Par conséquent, le but de la présente étude était de rechercher par des techniques de biologie moléculaire la présence de bactéries (*Rickettsia* spp et *C. burnetii*) dans des tiques collectées chez du bétail dans la région nord-ouest de l'Algérie.

II. Cadre d'étude et collecte des tiques :

Pour une caractérisation moléculaire des *C. burnetii* et *Rickettsia* spp dans tiques provenant des bovins et ovins. Un nombre total des 149 tiques ont été collectées chez des bovins et ovins dans 31 élevages de dans deux wilayas du nord-ouest de l'Algérie (Sidi Bel Abbès et Saida).

Cette étude a été menu dans la période allant de moins d'avril à septembre 2017.

Les élevages inclus dans la présente étude comprenaient 17 fermes bovines et 14 fermes des ovins. Pour les fermes bovines, trois fermes contenant des races pures (Prim'Holstein) et l'autre regroupent des races bovines mixtes. Pour les fermes des ovins, seulement quatre d'entre elles contenant des races pures (Ouled djellal et Hamra) et le reste des fermes regroupent des ovins de races mixte ou croisées (Tableau 08).

La collecte des tiques a été effectuée lors des visites ordinaires du vétérinaire praticien dans les fermes de ruminants avec collaboration du propriétaire. Les tiques ont été collectées chez des hôtes animaux à l'aide d'une pince fine.

Tableau 8: Récapitulatif sur le nombre des tiques collectées

Wilaya	Sidi Belabbes		Saida		Total
	Bovin	Ovin	Bovin	Ovin	
Nombre des fermes	9	9	8	5	31
Nombre des tiques collectées	39	47	40	23	149

III. Conservation et transport des échantillons :

Les tiques ont été collectées chez des hôtes animaux (bovin et ovin) à l'aide d'une pince fine et immédiatement stockées dans une boîte contenant l'alcool 70%. Les boîtes contenant les tiques ont été identifiées par des étiquettes précisant la date de la récolte, l'espèce animal, la région, et d'autres informations utiles, elles sont ensuite acheminées vers l'école nationale supérieure vétérinaire (Alger), puis transportés vers le centre de la rickettsiose et des maladies transmises par des arthropodes de l'hôpital universitaire San-Pedro-CIBIR (La Rioja, Espagne).

IV. Identification des tiques :

Les tiques ont été identifiées par des approches morphologiques à l'aide de clés taxonomiques (Walker et al. 2003 ; Estrada-Peña et al. 2004). L'identification des tiques au niveau du laboratoire a été effectuée par l'utilisation des clés taxonomiques normalisées et des critères morphologiques pour identifier le genre et l'espèce. L'identification a été réalisée à l'aide d'un Microscope utilisé dans l'identification morphologique des arthropodes. « Nikon SMZ1000 ».

Les caractères morphologiques utilisés pour l'identification du genre reposent sur l'observation des parties bien précises du corps de la tique :

- La longueur et la forme du rostre.
- La présence ou l'absence des yeux.
- La présence ou l'absence et position du sillon anal par rapport à l'anus.
- Présence ou absence des festons sur le bord postérieur de l'idiosome ; aspect du feston médian.
- La forme du coxal : Bifide ou non.

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *COXIELLA BURNETII*

- Présence, nombre et forme des plaques ventrales des mâles.
- L'aspect externe du port génital chez les femelles.

L'identification de l'espèce nécessite une observation et vérification plus approfondies de détails morphologiques de la tique, elle repose sur :

- La ponctuation du scutum.
- La forme des stigmates et des yeux.
- La forme du gonopore pour la femelle et des plaques adanales pour le mâle.
- Les caractères des sillons.
- La forme des festons



Figure 11: Microscope utilisé dans l'identification morphologique des arthropodes. « Nikon SMZ1000 ».

V. Analyses moléculaires

V.1 Extraction d'ADN :

V.1.1 Principe de l'extraction manuelle par adsorption sur colonne :

L'extraction de l'ADN des tiques et des bactéries éventuellement présentes dans les tiques a été faite par la méthode dite manuelle en utilisant le kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen. Cette méthode est rapide et simple et permet d'obtenir des ADN pures.

Le principe de cette méthode est basé sur l'absorption sur une matrice en silice contenant dans des tubes « colonnes », la matrice en silice est capable de fixer sélectivement les ADN en condition de force ionique élevée et en $\text{pH} \leq 7$. L'ADN est capté par la membrane de silice. La préparation passe dans une colonne de filtration. Les polysaccharides, les lipides et les protéines ainsi que les impuretés ne sont pas retenues à la membrane et sont donc éliminées par des lavages. L'ADN sont élués dans une solution en force ionique faible et à $\text{pH} \geq 7$ (ex. le tampon Tris/EDTA ou l'eau distillée).

V.1.2 Protocole expérimental de l'extraction de l'ADN :

Le Kit d'extraction d'ADN DNeasy Blood and Tissue de Qiagen comprend des solutions pré à l'emploi et d'autres nécessite une préparation préliminaire. Dans cette étude, le protocole de l'extraction de l'ADN a suivi les instructions du fabricant, brièvement nous avons entrepris comme suit :

- Toutes les étapes de l'extraction ont été menées dans des conditions biosécurité sous hotte à flux laminaire.
- Avant l'extraction d'ADN, toutes les traces de l'éthanol ont été éliminés par rinçage des tiques dans l'eau distillée trois fois pendant 3 minutes puis séchés sur un papier buvable stérile.
- Les tiques ont été coupées longitudinalement en deux parties l'aide d'un scalpel, une partie a été conservée par congélation à -80°C pour une utilisation ultérieure alors que l'autre partie a été utilisé pour l'extraction d'ADN.

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *COXIELLA BURNETII*

- L'ajout de 180 µl de tampon ATL sur la moitié de tique préalablement placée dans un tube de 1,5 ml.
- Puis, 20 µl de Protéinase K a été ajouté, et les tubes ont été mis à l'incubation à 56°C dans un incubateur-vortex jusqu'à lyse complète du tissu (pendant toute la nuit).
- Après incubation et dégradation du tissu de la tique, le tampon AL a été ajouté avec un volume de 200 µl, ensuite les tubes ont été bien mélangés et vortexés. Dans cette étape, il est important de s'assurer que les constituants des tampons ATL et AL sont bien dissous avant l'utilisation.
- Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100%) à l'échantillon et mélanger vigoureusement.
- Le mélange a été pipeté et déposé dans la colonne DNeasy qui est placée dans un tube collecteur de 2 ml. Procéder à la centrifugation de l'ensemble pendant une minute à ≥ 6000 x g (8000 rpm), puis jeter l'effluent et le tube collecteur.
- La colonne DNeasy est placée de nouveau dans un tube collecteur de 2 ml, ajouter 500 µl de tampon AW1 (préalablement additionné de l'éthanol) et centrifuger pendant une minute à ≥ 6000 x g (8000 rpm) puis jeter l'effluent et le tube collecteur.
- La colonne DNeasy est placée de nouveau dans un tube collecteur de 2 ml, ajouter 500 µl de tampon AW2 (préalablement additionné de l'éthanol) et centrifuger pendant 3 minutes à 13000 tours/min et jeter l'effluent et le tube collecteur.
- La colonne DNeasy est mise dans un tube propre de 1,5 ml, puis ajouter 200 µl de tampon AE. Après incubation pendant une minute à température ambiante, les tubes contenant la colonne ont été centrifugés pendant une minute à ≥ 6000 x g (8000 rpm).
- L'ADN recueilli a été vérifié pour sa concentration et sa pureté, pour éventuelle contamination avec des protéines et/ou les ARNs et les résidus des réactifs de l'extraction à l'aide d'un Nanodrop « NanoDdrop 1000, Thermo Scientific » (Figure 12).
- L'ADN élué dans le tube est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

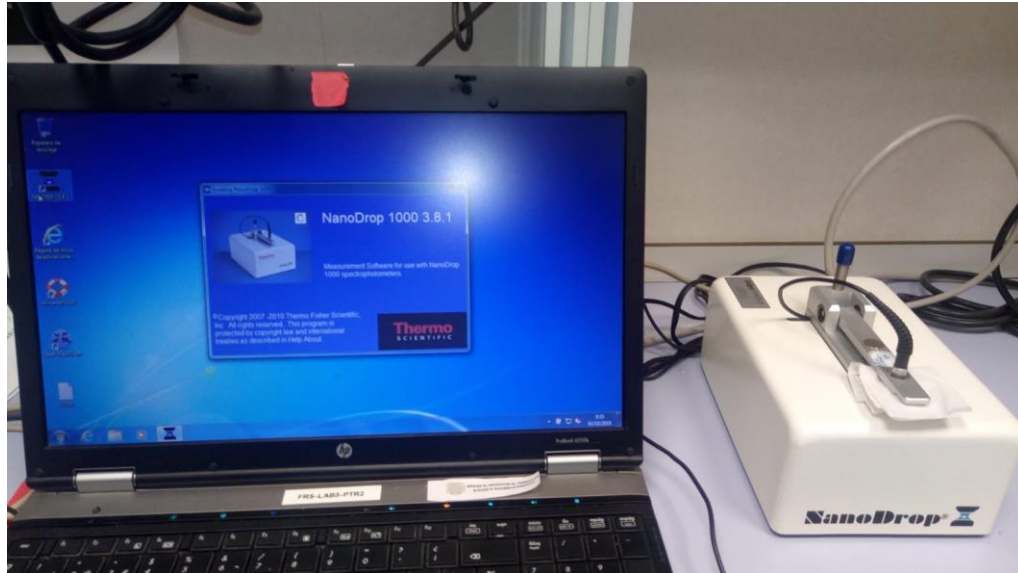


Figure 12: Appareil utilisé dans la mesure de quantité et la pureté de l'ADN extrait de tiques « NanoDrop 1000, Thermo Scientific » Photo personnelle.

V.2 Validation de classification des tiques par PCR

Pour un ensemble des tiques appartenant aux mêmes espèces selon l'identification morphologiques, des tiques ont été sélectionnées pour l'extraction de l'ADN et vérification de l'espèce par méthode moléculaire de PCR. Dans cette partie, identification des espèces a été réalisé par une PCR standard pour l'amplification des gènes spécifiques de l'identité situant dans l'ARN ribosomique 16S (gène 16S rRNA et 12S rRNA). Les échantillons ceux ayant donné des résultats douteux ou négatifs ont également été analysés à l'aide du test PCR amplifiant le gène de l'ARNr 12S (Beati et Keirans, 2001). Le protocole de PCR utilisé suit les recommandations de Black and Piesman (1994).

Brièvement, Le protocole du PCR comprend les étapes suivantes :

V.2.1 Préparation du mélange (Mix) :

Le Mix PCR contient les composants suivants : Tampon (Buffer), D-désoxynucléotides (dNTPs), MgCl₂, Taq Polymérase (Kapa Biosystem, Wilmington, MA, USA). La quantité de chaque composant est indiquée dans le tableau 09. A ce mix, les amorces suivantes ont été ajoutées : 16S+1, 16S-1, T1B et T2A. les caractéristiques des amorces utilisées sont détaillées dans le tableau 09. Un contrôle positif (extrait d'ADN d'*Ixodes ricinus*) et deux témoins négatifs,

l'un contenant de l'eau à la place de l'ADN matrice et l'autre avec l'ADN matrice mais sans amorces, ont été inclus dans le modèle.

Tableau 9: les caractéristiques des amorces utilisées dans la PCR de validation des espèces des tiques

	Gène ciblée	Nom de Primer	Primer sequence (5' → 3')	Taille de fragment (bp)	Référence
Espèce de tique	16S rRNA	16S+1 16S - 1	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCT GTGG CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	456	(Black et al., 1994)
	12S rRNA	T1B T2A	AACTAGGATTAGATACCCT AATGAGAGCGACGGGCGATGT	338	(Beati et al., 2001)

V.3 Recherche et identification des bactéries par PCR :

V.3.1 PCR standard :

Après la vérification à l'aide d'analyses de PCR de l'extraction adéquate de l'ADN et le contrôle des inhibiteurs de la technique de PCR dans les échantillons du pool. Les pools qui ont donné des résultats positifs pour ces tests PCR ont été analysés pour la présence de *Rickettsia* spp., et *C. burnetii* en utilisant des tests PCR standard. Ces tests ont été réalisés comme décrit par les auteurs en utilisant le kit KAPA Taq PCR (Kapa Biosystem, Wilmington, MA, USA), en suivant les recommandations du fabricant. Les amorces utilisées lors de la PCR standard sont spécifiques du gène *IS1111* des bactéries de l'espèce *Coxiella Burnetii*, ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 685 pb comme a été décrit précédemment par Massung et al. (1998). Pour des bactéries *Rickettsia* spp, les deux gènes *ompA* et *ompB* ont été utilisées. Les paires d'amorces PCR, la taille des amplicons (pb) et les températures d'hybridation des tests sont présentées dans le tableau 10.

Pour le contrôle positif, un extrait d'ADN de *Rickettsia slovacae* et l'ADN de *C. burnetii* d'une souche et préalablement identifiée ont été utilisés. Aussi, deux témoins négatifs, le premier contenant de l'eau au lieu de l'ADN matrice et le deuxième avec l'ADN matrice mais sans amorces, ont été inclus dans le protocole de PCR.

Tableau 10: Caractéristiques des amorces utilisées pour l'identification des agents pathogènes lors de la PCR standard.

	Gène ciblé	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')	Taille de fragment (bp)	Références
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>IS1111</i>	Trans1 Trans2	TATGTATCCACCGTAGCC AGTC CCCAACAACACCTCCTTA TTC	685	(Massung et al., 1998)
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>ompA</i> (semi-nested)	Rr190.70p Rr190.701n	ATGGCGAATATTTCTCCA AAA GTTCCGTTAATGGCAGCA TCT	631	(Roux et al., 1996) (Regnery et al., 1991)
		Rr190.70p Rr190.602n	ATGGCGAATATTTCTCCA AAA AGTGCAGCATTCGCTCCC CCT	532	
	<i>ompB</i> (nested)	rompB OF rompB OR	GTAACCGGAAGTAATCGT TTCGTAA GCTTTATAACCAGCTAAA CCACC	511	(Choi et al., 2005)
rompB SFG IF rompB SFG/TG IR		GTTTAATACGTGCTGCTA ACCAA GGTTTGGCCCATATACCA TAAG	420		

V.3.1.1 Préparation du Mix

Les mêmes constituants du Mix PCR ont été utilisés dans les réactions PCR pour la recherche des *Coxiella burnetii* et *Rickettsia* spp. Le mix contient les composants suivants : Tampon (Buffer), D-désoxynucléotides (dNTPs), MgCl₂, Taq Polymérase (Kapa Biosystem, Wilmington, MA, USA). La quantité de chaque constituant est indiquée dans le tableau 11.

Chaque constituant de ce mélange est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés. Le témoin positif et le témoin négatif doivent être pris en compte dans les calculs. Tous les constituants sont mélangés dans un seul tube Eppendorf pour garantir une distribution homogène de tous les

réactifs de la PCR. Par la suite, 40µl de ce mélange est distribué dans chaque microtube de barrettes PCR (barrettes à 8) stériles préalablement numérotées.

Tableau 11: Produits du mix de PCR standard pour Coxiella burnetii et Rickettsia spp.

	[] initial	[] final	V (µl)
10X Buffer with Mg ²⁺	10x	1x	5
dNTPs (10mM)	10mM	0,2M	1
Primer forward	100µM	0,4µM	0,2
Primer reverse	100µM	0,4µM	0,2
Taq Kappa	----	----	0,2
Eau distillée	----	----	33,4
Total du mix	----	----	40

V.3.1.2 Réaction de PCR :

Les échantillons d'ADN issus de l'extraction ainsi que les témoins ont été ajoutés dans les barrettes PCR contenant le mix en raison de 10µl. Donc le volume total dans chaque microtube sera de 50µl. Les mélanges réactionnels sont introduits dans le thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, AB Applied biosystems, California, USA). Ce dernier doit être programmé selon l'espèce bactérienne (Tableau 12 et 13).

Tableau 12: Programmes du thermocycleur pour la recherche du *C. burnetti*.

	Température	Temps	Etapes
Un cycle	94°C 66--> 61°C 72°C	30 secondes 1 minute 1 minute	Dénaturation initiale
35 cycles	94°C 60 72°C	30 secondes 30 secondes 1 minute	Dénaturation Hybridation Elongation
Dernière cycle	72°C	7 minutes	Elongation finale.



Figure 13: Thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, AB Applied biosystems, California, USA) utilise dans la réaction de PCR (Photo personnelle).

Tableau 13: Programmes du thermocycleur pour la recherche du *Rickettsia* spp.

	Température	Temps	Étapes
Un cycle	95° C	5 min	Dénaturation initiale
35 cycles	95° C	15 s	Dénaturation
	54° C	15 s	Hybridation
	72° C	30 s	Elongation
Dernière cycle	72° C	7 min	Elongation finale.

V.3.1.3 Visualisation des fragments d'ADN par électrophorèse

a. Préparation du gel d'Agarose

Le gel d'agarose a été préparé à une concentration de 1,5% selon le protocole suivant :

- Ajouter 1,5 g d'agarose au 100ml de TBE 1X (Tris-Borate-EDTA : 130 mM Tris, 45 mM Borate, 2,5 mM EDTA, pH 9),
- Chauffer le mélange dans un four à Micro-onde, pendant 2 à 3 minutes.
- Après refroidissement à une température entre 50 à 60 °C, on ajoute 4µl de BET (bromure d'éthidium). Le BET est un produit très dangereux (mutagène) et doit être manipulé avec une extrême précaution sous une hotte et avec des gants spéciaux conçu à ce type de manipulation.
- Après avoir positionner le peigne au fond dans la cuve. Le gel est coulé doucement sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.
- Laisser refroidir pour que le gel soit polymérisé au bout de 15 à 20 minutes à température ambiante, enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.

b. Dépôt des échantillons dans les puits du gel

- Sur un morceau de parafilm, mélanger 3µl de tampon de charge 10 x (Bleu de Bromophénol et 5µl de produit de PCR ensuite prélever le mélange avec une micropipette.
- Déposer dans le premier et le dernier puits 5µl du marqueur de poids moléculaire (PM) d'une concentration de 0.25µg/µl sans ajout de bleu de charge.
- A l'aide d'une micropipette, remplir les puits avec prudence pour ne pas endommager le fond du gel avec la pointe de la micropipette.

- Remplir les deux avant derniers puits du gel par les deux témoins (positif et le témoin négatif) et en fin déposer les échantillons dans les autres puits.

c. Migration et visualisation de l'ADN

- Fermer soigneusement la cuve. Brancher les fils à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient côté cathode (-). L'ADN est naturellement chargé négativement, ce qui lui permet de migrer vers l'anode (+) une fois le champ électrique est appliqué.
- Appliquer une tension de 120 volts pendant environ 30 minutes de migration.
- Débrancher le générateur de la cuve et récupérer le gel dans son support à l'abri de la lumière.
- La révélation du profil électrophorétique a été réalisée à l'aide de l'imageur moléculaire (ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA).

V.4 Identification de *C. burnetii* par qPCR :

La présence de *C. burnetii* a été vérifié par des tests PCR en temp real. Ce test a été réalisé comme décrit par les auteurs en utilisant le prémix Ex Taq (Probe qPCR) (Takara Bio Inc., Shiga, Japon) en suivant les recommandations du fabricant.

Pour la réalisation du qPCR, le Mix PCR a été préparé par ajout les amorces et les sondes au Master mix. Les constituant du mix ainsi que leur quantité sont présentés dans le tableau 14.

Les amorces utilisées lors de la qPCR sont spécifique du gène *IS30* des bactéries de l'espèce *Coxiella Burnetii*. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 120 pb comme a été décrit précédemment par (Willems et al., 1994).

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *COXIELLA BURNETII*

Tableau 14: Caractéristiques des amorces et sondes utilisées pour l'identification *Coxiella Burnetii* par qPCR.

	Gène ciblée	Nom de Primer	Primer sequence (5' → 3')	Taille de fragment (bp)	Référence
<i>Coxiella burnetii</i>	IS30 (Real Time)	Cbis30aF Cbis30aR Probe IS30a	AATGTCTGCGGGAAAT AGGC GAGGCCTTTTACCGGA ATTC FAM- TCGAGATCATAGCGTCA TT-TAMRA	120	(Willems et al., 1994)



Figure 14: 7300 Real Time PCR System. APPLIED BIOSYSTEMS, California, USA.
Utilisé pour la détection de *C. burnetii* dans les tiques

V.5 Séquençage

Tous les produits de PCR ont été séquencés dans les deux sens à l'aide du kit de séquençage en cycle BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Forest City, Californie, États-Unis) avec résolution du produit en séquence (Prism 3130; ABI) à l'unité de séquençage, CIBIR, Espagne. Les séquences nucléotidiques ont été analysées et comparées à celles disponibles dans la base de données NCBI en utilisant BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les séquences obtenues qui différaient de toute autre séquence disponible auprès de GenBank ont été soumises à l'aide du logiciel Sequin (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>). Un arbre phylogénétique a été construit par la méthode de jonction entre voisins à l'aide de MEGA version 7 (www.megasoftware.net). Les valeurs de confiance pour les branches individuelles de l'arbre résultant ont été déterminées par analyse bootstrap avec 1000 répliqués. Les distances d'évolution ont été calculées à l'aide de l'approche du maximum de vraisemblance composite (MCL).

VI. Résultats d'identification des tiques :

VI.1 Distribution des tiques en fonction leur espèces

Sur un total de 149 tiques engorgées ou partiellement engorgées collectées. L'identification morphologique a permis de classer en quatre espèces différentes : *Rhipicephalus bursa* (n = 74; 49,7%), *Hyalomma excavatum* (n = 68; 45,6%), *Hyalomma scupense* (n = 3; 2%) et *Hyalomma marginatum* (n = 4; 2,7%) (Figure 15 et 16). Toutes les tiques étaient des tiques adultes. Les résultats de l'identification du sexe et de l'espèce des tiques récoltées sont mentionnés dans le tableau 15.

La classification moléculaire de tiques a confirmé l'identification morphologiques. Plus précisément, trois spécimens de *R. bursa* ont montré une identité de 100% avec la séquence KR870983 déposée dans GenBank, et les trois autres, représentant 99,8% de cette séquence. Les séquences nucléotidiques obtenues à partir des spécimens de *H. excavatum*, identiques entre elles, et celle de *H. scupense* ont montré une identité de 99,8% avec les séquences sous les numéros d'accèsion GenBank KU130429 et KC203349, respectivement. La séquence d'ARNr 16S restante correspondait à un échantillon de *H. marginatum* et était identique à 100% à la séquence déposée sous le numéro d'accès GenBank L34307.

Tableau 15: Résultats d'identification morphologique et moléculaire des tiques collectées.

Origine	Région	<i>R. bursa</i>		<i>H. excavatum</i>		<i>H. Detritum</i>		<i>H. marginatum</i>	
		M	F	M	F	M	F	M	F
Bovins	S. B. A	9	3	25	0	0	0	0	2
	Saida	0	3	25	9	0	3	0	0
Ovins	S. B. A	17	23	2	3	0	0	1	1
	Saida	5	14	0	4	0	0	0	0

M: Male, F: Femelle

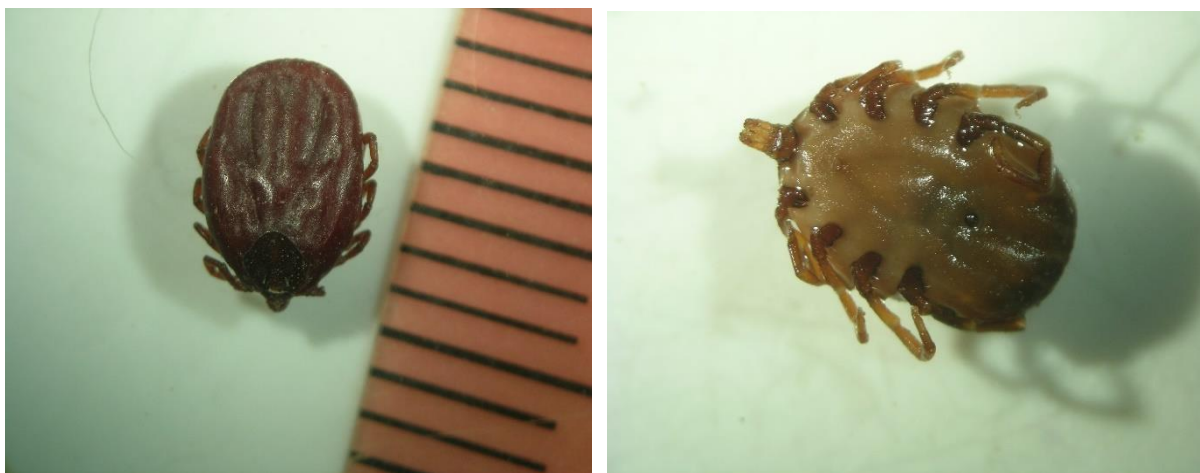


Figure 15: *Rhipicephalus bursa* face dorsale et ventrale au Microscope. « Nikon SMZ1000 » sous Gr. 100×. (Photo personnelle).



Figure 16: *Hyalomma excavatum* face dorsale et ventrale au Microscope. « Nikon SMZ1000 » sous Gr. 100×. (Photo personnelle).

VI.2 Distribution des tiques collectés en fonction des espèces et de la région :

Les résultats de distribution des espèces des tiques préalablement identifiées en fonction des régions où quel les échantillons ont été prélevés est présentés dans le tableau 16. On observe que parmi les quatre espèces des tiques, le nombre le plus élevé est représentés par l'espèce *R. bursa* (n=74 ; 49,7%) suivi par l'espèce *H. excavatum* (n=68 ; 45,6%). Pour l'espèce *R. bursa*, un nombre significativement plus élevé ($P < 0,001$) des tiques est trouvé chez les ovins que chez les bovins, que ce soit dans la wilaya de Sidi Bel Abbes ou Saida. En revanche, pour l'espèce *H. excavatum*, les nombre est significativement plus élevé ($P < 0,001$) chez les bovins que chez les ovins.

Tableau 16: Distribution des tiques collectés en fonction d'espèce et de la région.

Espèce de tique	Sidi Belabbes		Saida		Total
	Bovins	Ovins	Bovins	Ovins	
<i>R. bursa</i>	12	40	3	19	74
<i>H. excavatum</i>	25	5	34	4	68
<i>H. scupense</i>	0	0	3	0	03
<i>H. marginatum</i>	2	2	0	0	04
Total	39	47	40	23	149

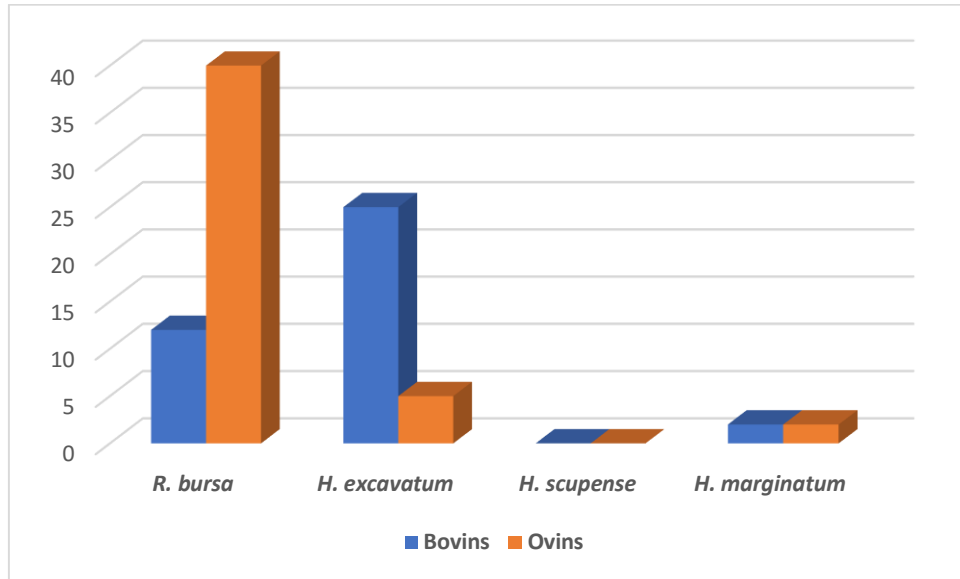


Figure 17: Distribution des espèces des tiques dans la wilaya de Sidi Belabes

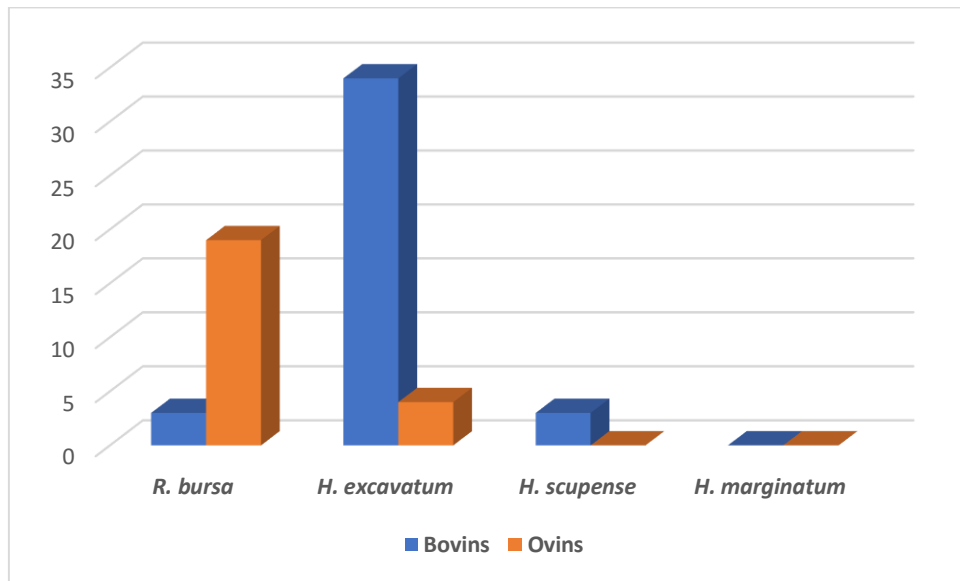


Figure 18: Distribution des espèces des tiques dans la wilaya de Saida

VII. Résultats de recherche des bactéries pathogènes :

VII.1 Résultats d'amplification par PCR :

Au total un nombre de 16 souches de *C. burnetti* ont été identifiées dans les tiques collectées, dans laquelle 11 souches trouvés dans des tiques femelles et le reste dans des tiques males. Parallèlement, un nombre de 36 souches de *Rickettsia* ont été identifiés dans les tiques collectées, ces souches sont majoritairement trouvées dans tiques males (23 tiques) (Tableau17). Les souches de *Rickettsia* trouvées appartiennent aux espèces *Rickettsia aeschlimannii* (8 souches) et *Candidatus R. barbariae* (28 souches).

Tableau 17: Résultats de recherche des bactéries dans les tiques

	<i>C. burnetti</i>	<i>Rickettsia</i> spp
Male	5 (84)	23
Femelle	11 (65)	13
Total	16	36

La distribution des nombres des souches des bactéries identifiées selon les espèces animales a montré que *C. burnetti* est souvent trouvés dans les tiques collectées à partir des ovins que ce soit pour la wilaya de Sidi BelAbbes ou la wilaya e Saida (Tableau 18). L'espèce *Rickettsia aeschlimannii* a été trouvé seulement dans les tiques collectées à partir des ovins dans la willaya Sidi BelAbbes et seulement dans les tiques collectées à partir des bovins dans la willaya de Saida. Cependant, l'espèce *Candidatus R. barbariae* a été trouvées uniquement dans les tiques collectées dans la wialya de Sidi BelAbbes avec un taux presque similaires pour les bovins et les ovins.

Tableau 18: Résultats de recherche des bactéries dans les tiques en fonction de l'espèce animale

	Espèce	<i>C. burnetti</i>	<i>Rickettsia Spp</i>	
			<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>Candidatus R. barbariae</i>
Sidi Bel Abbes	Bovin	5	0	13
	Ovin	7	3	15
Saida	Bovin	00	5	0
	Ovin	4	0	0

La distribution des nombres des souches des bactéries identifiées selon les espèces des tiques a montré que *C. burnetti* est trouvés à un nombre presque similaire dans les tiques *R. bursa* *H. excavatum* (Tableau 19). L'espèce *Rickettsia aeschlimannii* a été trouvé seulement dans les tiques d'espèce *Hyalomma*. Alors que, l'espèce *Candidatus R. barbariae* a été trouvées en grand nombre dans les tiques collectées dans les tiques d'espèce *R. bursa* et uniquement dans la wialya de Sidi BelAbbes.

Tableau 19: Résultats de recherche des bactéries dans les tiques en fonction de l'espèce de tique.

Espèce de tique	<i>C. burnetti</i>	<i>Rickettsia</i>	
		<i>R. aeschlimannii</i>	<i>Candidatus R. barbariae</i>
<i>R. bursa</i>	7	0	23
<i>H. excavatum</i>	9	5	5
<i>H. scupense</i>	0	0	0
<i>H. marginatum</i>	0	3	0
Total	16	8	28

VII.2 : Résultats d'identification moléculaire des bactéries trouvées dans les tiques.

Les amplicons *ompA* et *ompB* spécifiques à *Rickettsia* ont été obtenus à partir de 36 tiques. L'analyse des séquences a montré la présence de *R. aeschlimannii* dans 8 tiques dont 5 tiques d'espèce *H. excavatum* et 3 tiques d'espèce *H. marginatum*. En outre, '*Candidatus Rickettsia barbariae*' a été trouvé dans 5 tiques de *H. excavatum* et 23 tiques de *R. bursa*. Tableau 17. La

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *COXIELLA BURNETII*

révélation sur gel d'agarose des produits de PCR, des amplifications des gènes ompA et ompB ont été obtenus (figure 19 et 20)

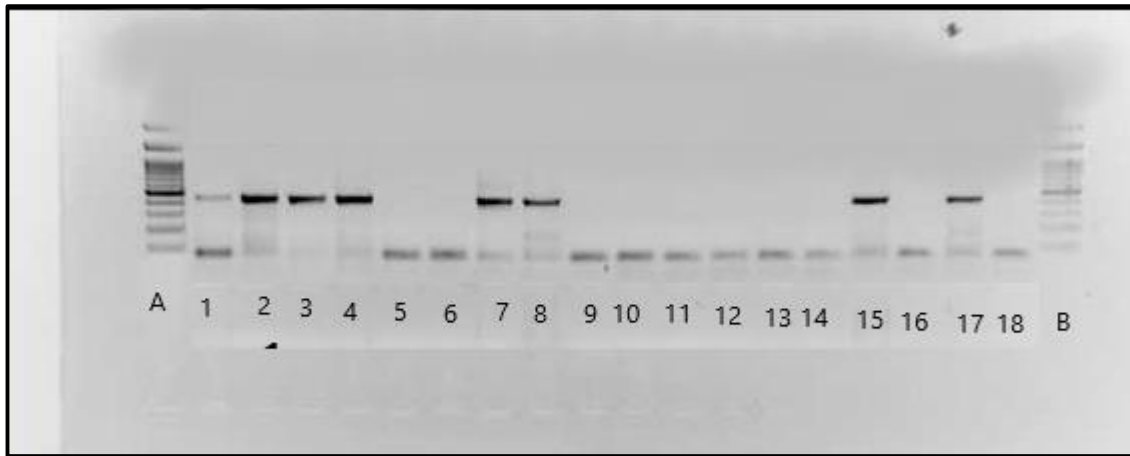


Figure 19: Photographie de la migration sur gel d'agarose à 1,5 % des produits d'amplification par PCR d'une portion du gène ompA de *Recketsia* spp.

(A : et B : Marqueur d'ADN 100 pb, 1 : contrôle positif, 2_17 : échantillons à tester,18 contrôle négatif)

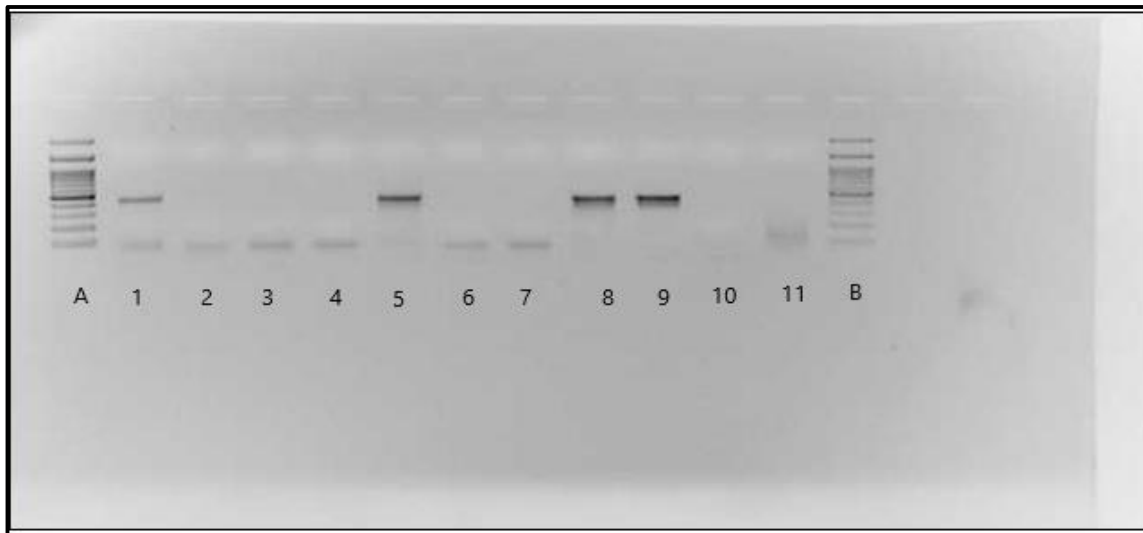


Figure 20: Photographie de la migration sur gel d'agarose à 1,5 % des produits d'amplification par PCR d'une portion du gène ompB de *Recketsia* spp.

(A : et B : Marqueur d'ADN 100 pb, 1 : contrôle positif, 2_10 : échantillons à tester,11 contrôle négatif)

Les séquences obtenues à partir du second tour des tests PCR *ompA* (484–487 pb) et *ompB* (367 pb) correspondant aux sept échantillons étaient identiques et aussi étaient identiques à 100% aux séquences portant les numéros d'accès au GenBank JF700253 et KY233287, respectivement.

De plus, un fragment plus long du gène *ompA* (587 pb) et deux du gène *ompB* (420 pb) ont été obtenus à partir des tiques de *R. bursa* des premiers tours des tests PCR. Le fragment plus long de la séquence *ompA* était identique à la séquence JF700253 mais les deux plus longues séquences *ompB* présentaient un changement avec la séquence KY233287 (tableau 17).

L'arbre phylogénétique basé sur le plus long fragment de gène *ompA* obtenu a montré une homologie (identité à 100%) avec une souche de cette espèce *Candidatus* détectée en Chine (numéro d'accès GenBank KU645284) (figure 19).

Coxiella burnetii a été amplifié à partir de 9 tiques de *H. excavatum* en utilisant deux gènes cibles. De plus, 7 tiques de *R. bursa* ont testé des résultats positifs pour cette bactérie avec un seul gène cible. Ces résultats sont résumés dans le tableau 17.

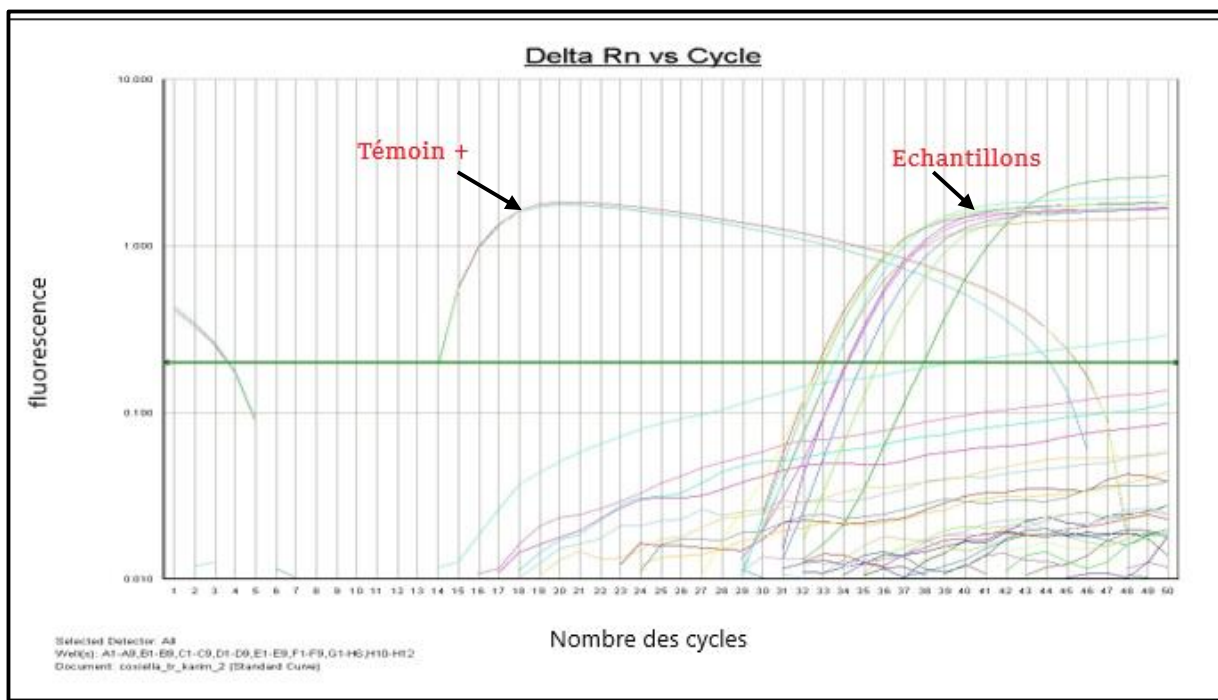


Figure 21: Les courbes de représentation d'amplification de gène IS1111 de *C. burnetii* par qPCR. (Photo personnelle)

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *COXIELLA BURNETII*

Figure 22: Les courbes de représentation d'amplification de gène IS1111 de *C. burnetii* par qPCR.

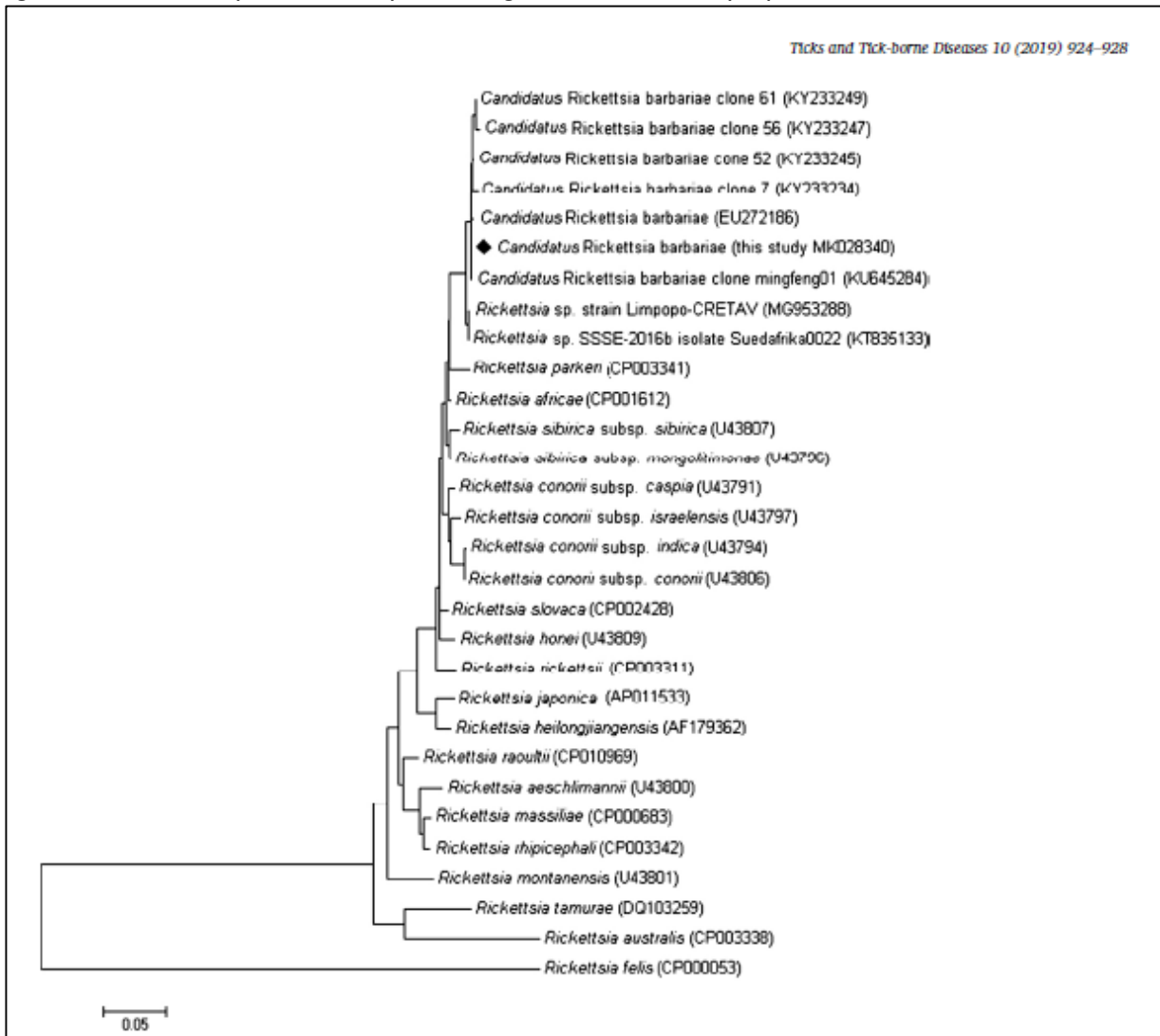


Figure 23: Dendrogramme sans racine montrant la position phylogénétique de la souche de «*Candidatus Rickettsia barbariae*» (◆) détectée dans la présente étude, parmi les espèces valides de *Rickettsia* et d'autres souches de «*Candidatus*». La phylogénie est déduite de la captation des séquences de nucléotides *ompA* (553pb) par la méthode de jonction avec le voisin (1000 répliquats). Les numéros d'accessions au GenBank des séquences utilisées dans la comparaison sont indiqués entre parenthèse.

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE COXIELLA BURNETII

Tableau 20: Résultats de l'identification moléculaire de *Coxiella burnetii* et des *Rickettsia* spp dans les tiques.

Bactérie	Espèce de tique	Région et Origine	Gène	% D'identification (pb) et n° dans GenBank	Gène	% D'identification (pb) et n° dans GenBank
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>H. excavatum</i> (9 tiques)	SBA/Bovin	<i>IS30</i>	100 (122/122)- CP014563	<i>IS1111</i>	99.6 (550/552)- CP018150
		Saida/Ovin	<i>IS30</i>	100 (122/122)- CP014563	<i>IS1111</i>	100 (604/604)- CP018150
	<i>R. bursa</i> (7tiques)	SBA/Ovin	<i>IS30</i>	100 (122/122)- CP014563	<i>IS1111</i>	PA
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>H. excavatum</i> (5tiques)	Saida/Bovin	<i>ompA</i>	100 (590/590)- U43800	<i>ompB</i>	99.6 (483/485) AF123705
	<i>H. marginatum</i> (3 tiques)	SBA/Ovin	<i>ompA</i>	100 (491/491)- HQ335157	<i>ompB</i>	100 (382/382)- KJ663755
<i>Candidatus R. barbariae</i>	<i>H. excavatum</i> (5 tiques)	SBA/Bovin	<i>ompA</i>	100 (487/487)- JF700253	<i>ompB</i>	100 (367/367)- KY233287
	<i>R. bursa</i> (23 tiques)	SBA/Bovin	<i>ompA</i>	100 (484/484)- JF700253	<i>ompB</i>	100 (367/367)- KY233287
		SBA/Ovin	<i>ompA</i>	100 (484/484)- JF700253	<i>ompB</i>	100 (367/367)- KY233287

PA: Pas amplifié.

VIII. Discussion :

Les pertes économiques causées par les maladies transmissibles par les tiques et surtout celles qui sont résistantes aux acaricides sont importantes, par le fait des cas des avortements chez le cheptel animal, et aussi les frais de traitement considérables. Parmi ces maladies, la Fièvre Q fait l'attention et être inclus dans tout programme de diagnostic et de lutte. Cette partie de l'étude constitue une contribution dans l'objectif est de connaître les différentes espèces des tiques envahissant les animaux de la région d'étude, ainsi que d'identifié les principales bactéries transmissibles dans les tiques.

Dans cette étude, 149 tiques collectés à partir des troupeaux bovins (n = 79/ 53%) et ovins (n = 70 / 47%) appartenaient à deux genres et quatre espèces. *Rhipicephalus bursa* (n = 74/ 49,7%), a été l'espèce la plus fréquente suivie par *Hyalomma excavatum* (n = 68/ 45,6%). Par contre une petite population *Hyalomma marginatum* (n = 4/ 2,7%) et *Hyalomma scupense* (n = 3/ 2%) a été collectée. Dans cette étude, la prédominance de l'espèce *Rhipicephalus bursa* et *H. excavatum* peut expliquer par l'effet de climat sèche qui caractérisent cet région, il a été rapporté que ces tiques sont communes dans les régions les plus sèches des hauts plateaux et du sud de l'Algérie, ainsi que dans d'autres pays méditerranéens (Benchikh Elfegoun M.C., 2013; Boulkaboul A., 2003). Ces résultats corroborent aussi ceux obtenues en Tunisie par Rjeibi et al. (2016a, 2016b) qui ont trouvé que *H. excavatum* (n=118/140; 84,3%;) a été la plus dominante dans la région centrale du Tunisie caractérisée aussi par un étage climatique semi-aride. Bouattour et al., 1999 ont observé que *R. bursa* est l'espèce la plus dominantes dans les région semi-aride et humide du Tunisie.

Généralement ces espèces des tiques sont observées chez les mammifères domestiques et sauvages tels que les artiodactyles, les carnivores, les lagomorphes (hôte préférentiel pour les stades immatures), les autres animaux de petite taille, et occasionnellement des oiseaux (Ben Said et al., 2016, 2015; Gharbi et al., 2015).

Dans la présente étude, *C. burnetii* et *Rickettsia aeschlimannii* ont été découverts dans des tiques du nord-ouest de l'Algérie et « *Candidatus R. barbariae* » a été détecté pour la première fois dans le nord de l'Afrique.

Coxiella burnetii a été détectée chez plusieurs espèces de tiques, notamment dans *R. bursa* en Algérie ou dans *H. excavatum* en Afrique (Eldin et al., 2017; Aouadi et al., 2017; Loftis et al., 2006). Bien que la présence d'une bactérie dans les tiques engorgées ne démontre pas leur rôle de vecteurs et / ou de réservoirs mais suggère que *C. burnetii* est largement répandu et prouve la circulation de cet microorganisme dans une région et donne des informations sur son éco-épidémiologie. Le rôle réel de ces arthropodes dans la propagation d'une maladie nécessite des investigations complémentaires.

Des cas d'infection humaine et vétérinaire par *C. burnetii* ont été signalés en Algérie (Pierrou et al., 1956; Angelakis et al., 2014; Rahal et al., 2018). Chez l'homme, l'infection se produit principalement par inhalation de bactéries en aérosol où les animaux d'élevage sont l'un de plus importants réservoirs de cet agent pathogène. Le rôle des tiques en tant que vecteurs a été suggéré mais n'a pas été démontré (Eldin et al., 2017).

La présence de *R. aeschlimannii* dans *H. excavatum* et *H. marginatum* a été déjà documentée en Algérie (Bitam et al., 2006; Parola et al., 2013; Leulmi et al., 2016), Ces auteurs ont rapportés que *H. marginatum* est considéré comme le vecteur le plus important de cet agent zoonotique. Des cas endémiques d'infection à *R. aeschlimannii* se sont déclarés en Algérie, bien que le pouvoir pathogène de ce microorganisme ne semble pas être grave (Oteo et al., 2005; Mokrani et al., 2008; Portillo et al., 2015).

Les techniques moléculaires ont permis l'identification de plusieurs 'Candidatus' chez des espèces de *Rickettsia* non cultivées, notamment « *Candidatus R. barbariae* ». Les gènes fragmentés (gènes *gltA*, *ompA* et *ompB*) de ce 'Candidatus' ont été amplifiés pour la première fois à partir de tiques de *R. bursa* en Portugal, puis une caractérisation génétique plus approfondie a été réalisée à partir d'une souche obtenue du *R. turanicus* provenant d'animaux domestiques en Italie (De Sousa et al., 2006; Mura et al., 2008). Jusqu'à présent, 'Candidatus *R. barbariae*' a été signalé chez des tiques d'Europe (Portugal, Italie, Grèce, Chypre et France), d'Asie (Chine, Liban et Palestine) et récemment d'Afrique (Cameroun et Afrique du Sud) (De Sousa et al., 2006; Mura et al., 2008; Chochlakis et al., 2012; Socolovschi et al., 2012; Papa et al., 2016; Guo et al., 2016 ; Ereqat et al., 2016 Fernández de Mera et al., 2018; Vanegas et al., 2018; Halajian et al., 2018). En outre, de nouvelles « *Candidatus spp.* » ont été proposées pour des souches étroitement apparentées en Afrique du Sud et au Kenya, nommées respectivement

« *Candidatus Rickettsia rhabdomydis* » et « *Candidatus Rickettsia moyalensis* » (Kimita et al., 2016; Essbauer et al., 2018). Néanmoins, à notre connaissance, il n'a pas été détecté auparavant dans le nord de l'Afrique. Cette bactérie a été principalement amplifiée à partir de tiques, en particulier d'espèces de *Rhipicephalus* (*R. turanicus* et *R. sanguineus*) dans la majorité des cas, mais également de *R. bursa* (*Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus lunulatus* ou *Rhipicephalus simus*) (De Sousa et al., 2006; Mura et al., 2008; Halajian et al., 2018). Il a été également détecté dans d'autres genres de tiques tels que *Amblyomma* ou *Hyalomma*, mais pas chez *H. excavatum* (Ereqat et al., 2016; Kimita et al., 2016; Fernández de Mera et al., 2018; Vanegas et al., 2016). De plus, il a été trouvé chez d'autres arthropodes tels que la puce *Vermipsylla alakurt* (Zhao et al., 2016). Ainsi, la bactérie a été amplifiée à partir de tissus de chats polaires (*Vormela peregusna*) ou de rongeurs (*Rhabdomys pumilio*) (Liu et al., 2018; Essbauer et al., 2018). Le potentiel pathogène de *Candidatus R. barbariae* reste inconnu, il n'a pas été associé à des maladies humaines ou animales, bien qu'il ait été identifié dans une tique de *R. bursa* prélevée sur une femme en Grèce (Papa et al., 2016). Davantage, des études devraient être menées pour élucider les vecteurs, les réservoirs et le potentiel pathogène de ce micro-organisme.

Conclusion :

Cette étude a été menée dans la région de Sidi Belabbes et Saida, elle subdivisée en deux approches, la première vise à évaluer la séroprévalence de *C. burnetii* par test ELISA. Pour cela, 180 sérums ont été collectés des ovins présentant des avortements, parallèlement des renseignements ont été collectés afin de déterminer les principaux facteurs de risques de cette maladie. La deuxième approche moléculaire, s'est portée sur une détermination des espèces des tiques collectées des ovins et bovins dans la région d'étude, ainsi qu'une identification par qPCR, PCR classique et le séquençage d'ADN des espèces des *Coxiella burnetii* existant dans la région d'étude.

A l'issue de l'enquête sérologique par le test ELISA et des données épidémiologiques collectées au moyen d'un questionnaire, nous avons obtenu une séroprévalence individuelle de l'ordre de 27,8 % \pm 7 et une séroprévalence de troupeau de 71,8 %. Le pourcentage le plus élevé d'échantillons positifs a été trouvé à daïra de Tanira (50%).

De l'analyse de tous les facteurs de risque possibles pour la transmission de la fièvre Q, quatre principaux facteurs de risque avaient eu lieu : les mesures de biosécurité insatisfaisante, la grande capacité de la ferme, la proximité des exploitations et leur concentration dans les zones d'élevage spécifiques pourraient favoriser la transmission de *C. burnetii* à Sidi Bel Abbes.

Dans la deuxième approche, un total de 149 tiques collectés sur 31 cheptels (16 cheptels bovins et 15 cheptels ovins), *Coxiella burnetii* a été amplifié dans 7 tiques d'espèce *Rhipicephalus bursa* et 9 tiques d'espèce *Hyalomma excavatum*. De plus, *Rickettsia* spp a été identifiée dans 36 tiques dont 8 souches de *R. aeschlimannii* détecté dans les tiques d'espèce *Hyalomma* (3 *H. marginatum* et 5 *H. excavatum*) et 28 souches de *Candidatus R. barbariae* détecté dans les tiques d'espèce *Hyalomma excavatum* et *R. bursa*

A l'issue des résultats obtenues, l'investigation moléculaire confirme la présence des agents pathogènes comme *C. burnetii* chez les tiques prélevées à partir des animaux d'élevage ; ces animaux cliniquement présentant des cas d'avortement et ont déjà étaient serologiquement positifs aux test ELISA. Ce qui incite à améliorer les conditions de biosécurité au niveau des fermes et la lutte contre les tiques comme vecteur potentiel de *C. burnetii*.

La connaissance de la prévalence réelle de l'infection peut conduire à un meilleur choix des mesures de contrôle, ce qui pourrait influencer sur la décision de mettre en œuvre ou non un programme de lutte. Cette information pourrait aussi aider les décideurs et les vétérinaires afin de déterminer à quel niveau ce programme de contrôle (troupeau, au niveau local, régional) doit être mis en œuvre.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques.

- ACERSA. 2006. "Diagnostic d'un élevage cliniquement atteint de fièvre Q". 1–11.
- AFSSA. 2004. Fiebre Q : rapport sur l'évaluation des risques pour la santé publique et des outils de gestion des risques en élevage de ruminants » pp. 1–88.
- Amano K., Williams J. C., Missler S. R., Reinhold V. N. 1987. Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 262:4740–4747.
- Amano K., Williams J. C., Missler S. R., Reinhold V. N. 1987. Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 262:4740–4747.
- Anderson A., Bijlmer H., Fournier P. E., Graves S., Hartzell J., Kersh G. J. 2013. Diagnosis and management of Q fever—United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm. Rep.* 62: 1–30.
- Anderson T.D., Cheville N.F., Meador V.P., 1986a. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet. Pathol.* 23 (3): 227–239.
- Anderson T.D., Meador V.P., Cheville N.F. 1986b. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Vet. Pathol.* 23 (3): 219–226.
- Angelakis E., Mediannikov O., Socolovschi C., Mouffok N., Bassene H., Tall A., bNiangaly H., Doumbo O., Znazen A., Sarih M., Sokhna C., Raoult D. 2014. *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. *Int. J.Infect. Dis.* 28: 107–110.
- Angelakis E., Raoult D. 2010. Q fever. *Vet. Microbiol.* 140: 297–309.
- Angen O., Stahl M., Agerholm J., Christoffersen A. B., Agger J. F. 2011. Dynamics of relationship between the presence of *Coxiella burnetii* DNA antibodies and intrinsic variables in cow milk and bulk tank milk from Danish dairy cattle. *J Dairy Sci* 94: 5750–5759.
- Aouadi A., Leulmi H., Boucheikhchoukh M., Benakhla A., Raoult D., Parola P. 2017. Molecular evidence of tick-borne hemoprotozoan-parasites (*Theileria ovis* and *Babesia ovis*) and bacteria in ticks and blood from small ruminants in Northern Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 50: 34–39.
- Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A., Frangoulidis D., Bodier C.C., Souriau A., Meyer H., Neubauer H., Rodolakis A., Vergnaud G. 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology.* 6: 38, ISSN 1471-2180.
- Arricau-Bouvery N., Rodolakis A. 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res*, 36:327–349.

- Arricau-Bouvery N., Souriau A., Bodier C., Dufour P., Rousset E., Rodolakis A. 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats, *Vaccine*. 2(35): 4392–4402.
- Arricau-Bouvery N., Souriau A., Lechopier P., Rodolakis A. 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Veterinary Research*. 34(4): 423-433.
- Astobiza I., Barandika J. F., Hurtado A., Juste R. A., Garcia-Perez A. L., 2010. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *Veterinary Journal*. 184:172–175.
- Astobiza I., Barandika J.F., Juste R.A., Hurtado A., García-Pérez A.L., 2013. Evaluation of the efficacy of oxytetracycline treatment followed by vaccination against Q fever in a highly infected sheep flock. *Vet. J.* 196 (1): 81–85.
- Babudieri C. 1959. Q fever: A zoonosis. *Adv. Vet. Sci.* 5: 81–84.
- Baca O. G., Klassen D. A., Aragon A. S. 1993. Entry of *Coxiella burnetii* into host cells. *Acta Virol.* 37: 143–155.
- Beare P.A., Gilk S.D., Larson C.L., Hill J., Stead C.M., Omsland A. 2011. Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. *MBio*, 2: e00175–11.
- Beare P.A., Sandoz K., Omsland A., Rockey D., Heinzen R. 2011. Advances in genetic manipulation of obligate intracellular bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2:97.
- Beati L., Keirans J. E. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol*, 87:32-48.
- Behymer D., Riemann H.P. 1989. *Coxiella burnetii* infection (Q fever). *J. Am. Vet. Assoc.* 194(6): 164-767.
- Ben Said M., Belkahia H., Alberti A., Abdi K., Zhioua M., Daaloul-Jedidi M., Messadi L., 2016. First molecular evidence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in goats, sheep, cattle and camels in Tunisia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 23: 442–447.
- Benchikh-Elfegoun M.C., Gharbi M., Djebir S., Kohil K. 2013. Dynamique d'activité saisonnière des tiques ixodidés parasites des bovins dans deux étages bioclimatiques du nord-est algérien. *Revue d'élevage et médecine vétérinaire des pays tropicaux*. 66 (4) :117-122.
- Bennabi F., Hamel L., Bachir Bouadjra S. D. 2012. Ressources hydriques sous tension et enjeux de développement durable dans la wilaya de Sidi Bel Abbes (Algérie occidentale). 118: 105-111.
- Benson W.W., Brock D.W., Mather J. 1963. Serologic analysis of a penitentiary group using raw milk from a Q fever infected herd. *Public Health Rep.* 78: 707–710.

Berri M., Arricau-Bouvery N., Rodolakis A. 2003. PCR-based detection of *Coxiella burnetii* from clinical samples, in: Sachse K, Frey J. (eds.) *Methods in molecular biology*. Totowa: *Humana Press Inc*: 153-161.

Berri M., Larcoucau K., Rodolakis A. 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and faecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 72: 285-293.

Berri M., Rousset E., Hechard C., Champion J.L., Dufour P., Russo P. Rodolakis A. 2005b. Progression of Q fever and *Coxiella burnetii* shedding in milk after an outbreak of enzootic abortion in a goat herd. *The Veterinary Record* 156: 548-549.

Berri M., Souriau A., Crosby M., Crochet D., Lechopier P., Rodolakis A. 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet Rec.* 148: 502 –505.

Berri M., Souriau A., Crosby M., Rodolakis A. 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet. Microbiol.* 85: 55-60.

Bitam I., Parola P., Matsumoto K., Rolain J.M., Baziz B., Boubidi S.C., Harrat Z., Belkaid M., Raoult D. 2006. First molecular detection of *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078: 368–372.

Black W. C., Piesman J. 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:10034-10038.

Bossi P., Tegnell A., Baka A., Loock F., Hendriks F. 2004. Recommandations Bichat sur la prise en charge clinique des patients présentant une fièvre Q liée ou non à un acte de bioterrorisme, *Euro Surveillance.* 9: 12.

Bouattour A., Darghouth M.A., Daoud A. 1999. Distribution and ecology of ticks (Acari: Ixodidae) infesting livestock in Tunisia: an overview of eighth years field collections. *Parassitologia.* 41(1. 1): 5–10.

Boukaboul A. 2003. Parasitisme des tiques (*Ixodidea*) des bovins à Tiaret, Algérie. *Méd. Vét. Pays Trop.* 56 (3-4): 157-162.

Brooks D.L., Ermel R.W., Franti C.E., Ruppanner R., Behymer D.E., Williams J.C., Stephenson E.H. 1986. Q fever vaccination of sheep: challenge of immunity in ewes. *Am J Vet Res.* 47: 1235– 1238.

Burnet F.M., Freeman M. 1937. Experimental studies on the virus of “Q” fever. *Med J Aust* 2:299–305.

Buxton D., Barlow R.M., Finlayson J., Anderson I.E., Mackellar A., 1990. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.* 102 (2): 221–237.

Capo C., Lindberg F.P., Meconi S., Zaffran Y., Tardei G., Brown E.J., Raoult D., Mege J.L., 1999. Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii* impairment of the cross-talk between $\alpha_v\beta_3$ integrin and CR3. *J. Immunol.* 16: 6078–6085.

Carey K.L., Newton H.J., Lührmann A., Roy C.R., 2011. The *Coxiella burnetii* Dot/Icm system delivers a unique repertoire of type IV effectors into host cells and is required for intracellular replication. *PLoS Pathog* 7: e1002056.

Cetinkaya B., Kalender H., Ertas H. B., Muz, A., Arslan, N., Ongor, H., Gurcay, M. 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet. Rec.* 146:131–136.

CEVA, “Vaccines,” 2010, <http://www.ceva.com/en/Products/> Cattle/Vaccines.

Chiu C.K., Durrheim D.N. 2007. A review of the efficacy of human Q fever vaccine registered in Australia. *NSW Public Health Bull.* 18:133–136

Chmielewski T., Tylewska-Weirzbanowska S. 2012. Q fever at the turn of the century. *Polish J Microbiol* 61: 81-93.

Chochlakis D., Ioannou I., Sandalakis V., Dimitriou T., Kassinis N., Papadopoulos B., Tselentis Y., Psaroulaki A. 2012. Spotted fever group *Rickettsiae* in ticks in Cyprus. *Microb. Ecol.* 63: 314–323.

Choi Y.J., Lee S.H., Park K.H., Koh Y.S., Lee K.H., Baik H.S., Choi M.S., Kim I.S., Jang W.J. 2005. Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. *Clin Vaccine Immunol*, 12:759-763.

Coleman S.A., Fischer E.R., Howe D., Mead D.J., Heinzen R.A. 2004. Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J Bacteriol.* 186:7344–7352.

Cremoux R., Rousset E., Touratier A. 2011. “Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation,” in *Proceedings of the 6th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial diseases*, Heraklion, Crete, Greece.

Davis G.E., Cox H.R. 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I. Isolation from *Dermacentor andersonii*, reactions with animals, and filtration experiments. *Public Health Rep.* 53:2259–2276.

De Bruin A., De Groot A., De Heer L., Bok J., Wielinga P.R., Hamans M. 2011. Detection of *Coxiella burnetii* in complex matrices by using multiplex quantitative PCR during a major Q fever outbreak in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 77: 6516-6523.

De Sousa R., Barata C., Vitorino L., Santos-Silva M., Carrapato C., Torgal J., Walker D., Bacellar F. 2006. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1103–1108.

- Dellacasagrande J. 2000. $\alpha_v\beta_3$ integrin and bacterial lipopolysaccharide are involved in *Coxiella burnetii*-stimulated production of tumor necrosis factor by human monocytes. *Infect. Immun.* 68: 5673–5678).
- Derrick E.H. 1937. “Q” fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis, and laboratory investigation. *Med J.* 2:281–299.
- Dupont H. T., Thirion X., Raoult D. 1994. “Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence,” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 1: 189–196.
- Dupuy A. G., Caron E. 2008. Integrin dependent phagocytosis spreading from micro-adhesion to new concepts. *J. Cell Sci.* 121: 1773–1783.
- Dyer R.E. 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. IV. Human infection. *Public Health Rep.* 53:2277–2282.
- Dyer R.E. 1939. Similarity of Australian “Q” fever and a disease cause by an infectious agent isolated from ticks in Montana. *Public Health Rep.* 54:1229–1237
- Eldin C., Mélenotte C., Mediannikov O., Ghigo E., Million M., Edouard S., Mege J.L., Maurin M., Raoult D. 2017. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clin. Microbiol. Rev.* 30: 115–190.
- Ereqat S., Nasereddin A., Al-Jawabreh A., Azmi K., Harrus S., Mumcuoglu K., Apanaskevich D., Abdeen Z. 2016. Molecular detection and identification of spotted fever group *rickettsiae* in ticks collected from the West Bank, palestinian territories. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 : e0004348.
- Essbauer S., Hofmann M., Kleinemeier C., Wölfel S., Mathee S. 2018. *Rickettsia* diversity in southern Africa: a small mammal perspective. *Ticks Tick. Dis.* 9: 288–301.
- Fenollar F., Fournier P., Carrrieri M.P., Habib G., Messana T., Roul D. 2001. Risk factors and prevention of Q fever endocarditis. *Clin Infect Dis.* 33: 312-316.
- Fernández de Mera I.G., Blanda V., Torina A., Dabaja M.F., El Romeh A., Cabezas-Cru, A., de la Fuent, J. 2018. Identification and molecular characterization of spotted fever group *rickettsiae* in ticks collected from farm ruminants in Lebanon. *Ticks Tick.Dis.* 9: 104–108.
- Flannagan R. S., Jaumouillé V., Grinstein S., 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 7: 61–98.
- Fournier P. E., Marrie T. J., Raoult D. D. 1998. Diagnosis of Q fever. *J. Clin. Microbiol.* 36:1823–1834.
- Gharbi M., Omri H., Jedidi M., Zorii S., Darghouth M.A. 2015. Epidemiological study of sheep anaplasmosis (*Anaplasma ovis* infection) in Kairouan, Central Tunisia. *J. Adv. Parasitol.* 2: 30–34.

- Gimenez D. F. 1964. Staining *Rickettsiae* in yolk-sac cultures. *Stain Technol* 39:135–140.
- Glazunova O., Roux V., Freylikman O., Sekeyova Z., Fournous G., Tyczka J., Tokarevich N., Kovacava E., Marrie T.J., Raoult D. 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerging Infectious Disease*. 11: 1211-1217.
- Gonder J.C., Kishimoto R.A., Castello M.D., Pedersen Jr., Larson E.W. 1979. Cynomolgus monkey model for experimental Q fever infection. *J. Infect. Dis.* 139: 191–196.
- Guatteo R., Beaudreau F., Joly A., Seegers H. 2007. “Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk,” *Zoonoses and Public Health*. 54: 191–194.
- Guatteo R., Joly A., Rodolakis A. 2008. Prevention de l'excrétion de *Coxiella burnetii* a l'aide d'un vaccin dit phase I (Coxevac en troupeaux bovines laitiers infectes). *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*. 15 : 59–62.
- Guatteo R., Seegers H., Joly A., Beaudreau F. 2008. “Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine,” *Vaccin.*, 26:4320–4328.
- Guo L.P., Jiang S.H., Liu D., Wang S.W., Chen C.F., Wang Y.Z. 2016. Emerging spotted fever group *rickettsiae* in ticks, northwestern China. *Ticks Tick. Dis.* 7, 1146–1150.
- Hackstadt T. 1988. Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 56: 802–807.
- Hackstadt T., Williams J.C. 1981. Stability of the adenosine 5 ϕ -triphosphate pool in *Coxiella burnetii*: influence of pH and substrate. *J Bacteriol.* 148:419–425.
- Halajian A., Palomar A.M., Portillo A., Heynec H., Romero L., Oteo J.A. 2018. Detection of zoonotic agents and a new *Rickettsia* strain in ticks from donkeys from South Africa: implications for travel medicine. *Travel Med. Infect. Dis.* 26: 43–50.
- Hatchette T., Hudson R., Schlech W., Campbell N., Hatchette J., Ratnam S., Donovan C., Marrie T. 2000. Caprine-associated Q fever in Newfoundland. *Can. Commun. Dis. Rep.* 26: 17–19.
- Heinzen R.A., Hackstadt T., Samuel J.E. 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 7 : 149–154.
- Heinzen R.A., Scidmore M.A., Rockey D.D., Hackstadt T. 1996. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 64:796–809.
- Hendrix L.R., Samuel J.E., Mallavia L.P. 1991. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *Journal of General Microbiolog.* 137: 269-276.

Hermans M. H., Huijsmans A. C. R., Schellekens J. J. A., Savelkoul P. H. M., Wever P. C. 2011. *Coxiella burnetii* DNA in goat milk after vaccination with Coxevac. *Vaccine*. 29: 2653–2656.

Hogerwerf L. R., Van Den Brom H. I.J., Roest. 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, The Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 17:379–386.

Jager C., Lautenschlager S., Willems H., Baljer G. 2002. *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Vet Microbiol*. 89:161–166.

Jensen T.K., Montgomery D.L., Jaeger P.T., Lindhardt T., Agerholm J.S., Bille-Hansen V., Boye M. 2007. Application of fluorescent in situ hybridisation for demonstration of *Coxiella burnetii* in placentas from ruminant abortions. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 115: 347–353.

Johnson III J.E., Kadull P.J. 1966. Laboratory acquired Q fever. A report of fifty cases. *Am. J. Med*. 41: 391–403.

Karagiannis I., Schimmer B., Van Lier A., Timen A., Schneeberger P., Van Rotterdam B., 2005. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of the Netherlands. *Epidemiol Infect*. 137: 1283-1294.

Kennerman E., Rousset E., Gölcü E., Dufour P. 2010. Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the southern Marmara Region, Turkey. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 33: 37-45.

Khaled H., Sidi-Boumedine K., Merdja S., Dufour P., Dahmani A., Thiéry R., Rousset E., Bouyoucef A. 2016. Serological and molecular evidence of Q fever among small ruminant flocks in Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 47 : 19-25, doi: 10.1016/j.cimid.2016.05.002.

Kimita G., Mutai B., Nyanjom S.G., Wamunyokoli F., Waitumbi J. 2016. Phylogenetic variants of *Rickettsia africae*, and incidental identification of "*Candidatus Rickettsia moyalensis*" in Kenya. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 10 : e0004788.

Kinchen J. M., Ravichandran K. S. 2008. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 9: 781–795.

Kováčová E., Kazár J., Simková A. 1998. Clinical and serological analysis of a Q fever outbreak in western Slovakia with four-year follow-up. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 17: 867-869.

Kovacova E., Kazar J., Spanelova D. 1998. Suitability of various *Coxiella burnetii* antigen preparations for detection of serum antibodies by various tests. *Acta Virol*. 42: 365–368.

Krt B. 2003. “The influence of *Coxiella burnetii* phase I and phase II antigens on the serological diagnosis of Q fever in cattle,” *Slovenian Veterinary Research* 40: 203–207.

Krumbiegel E.R., Wisniewski H.J. 1970. Q fever in Milwaukee. II. Consumption of infected raw milk by human volunteers. *Arch. Environ. Health* 21: 63–65.

Kruszewska D., Tylewska-Wierzbanowska S. 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Res. Vet. Sci.* 62: 299–300.

Kuroiwa Y., Oyanagi R., Fuse S., Mori T., Ueno H., Tsutsumi H. 2007. Persistent hepatitis and repeated wheezing in an infant. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 26:763–769.

La Scola B., et Raoult D. 1996. “Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*,” *Journal of Clinical Microbiology.* 34:2270–2274.

Lang G.H., 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals. In: Marrie T.J., (Ed.), *The Diseases*, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 23–48.

LeJeune J.T., Rajala-Schultz P.J. 2009. Unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clin Infect Dis.* 48: 93-100.

Lennette E.H., Holmes M.A., Abinanti F.R., 1952. Q fever studies. XIV. Observations on the pathogenesis of the experimental infection induced in sheep by the intravenous route. *Am. J. Hyg.* 55: 254–267.

Leulmi H., Aouadi A., Bitam I., Bessas A., Benakhla A., Raoult D., Parola P. 2016. Detection of *Bartonella tamiae*, *Coxiella burnetii* and *rickettsiae* in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. *Parasit. Vectors* 20(9): 27.

Liu X., Yang M., Liu G., Zhao S., Yuan W., Xiao R., Hazihan W., Hornok S., Wang Y. 2018. Molecular evidence of *Rickettsia raoultii*, "*Candidatus Rickettsia barbariae*" and a novel *Babesia* genotype in marbled polecats (*Vormela peregusna*) at the China- Kazakhstan border. *Parasit. Vectors* 11: 450.

Loftis A.D., Reeves W.K., Szumlas D.E., Abbassy M.M., Helmy I.M., Moriarity J.R., Dasch G.A., 2006. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp. Appl. Acarol.* 40: 67–81.

Loukaides F., Hadjichristodoulou C., Soteriades E.S., Kolonia V., Ioannidou M.C., Psaroulaki A., Tselentis Y. 2006. Active surveillance of Q fever in human and animal population of Cyprus. *BMC Infect. Dis.* 6 : 48.

Luhrmann A., Nogueira C.V., Carey K.L., Roy C.R. 2010. Inhibition of pathogen-induced apoptosis by a *Coxiella burnetii* type IV effector protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 18997–19001.

Marmion B.P., Stoker M.G.P., Walker C.B.V., Carpenter R.G. 1956. Q fever in Great Britain—epidemiological information from a serological survey of healthy adults in Kentans East Anglia. *J. Hyg.* 54:118–140.

- Marrie T. J., Langille D., Papukna V., Yates L. 1989. "Truckin' pneumonia-an outbreak of Q fever in a truck repair plant probably due to aerosols from clothing contaminated by contact with newborn kittens," *Epidemiology and Infection*. 102: 119–127.
- Marrie T.J. 2010. Q fever pneumonia. *Infect Dis Clin North Am* 24:27–41.
- Martinov S.P., Neikov P., Popov G.V. 1989. Experimental Q fever in sheep. *Eur J Epidemiol*. 5: 428–431.
- Masala G., Porcu R., Sanna G., Chessa G., Cillara G., Chisu V., Tola S. 2004. Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. *Vet. Microbiol*. 99: 301–305.
- Massung R., Slater K., Owens J.H., Nicholson W.L., Mather T.N., Solberg V.B., Olson J.G. 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic *ehrlichiae*. *J Clin Microbiol*, 36:1090-1095.
- Maurin M., Raoult D. 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 518–553.
- Mccaul T.F., Williams J.C. 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol* 147:1063–1076.
- Mcdade J.E. 1990. Historical aspects of Q fever. In: Marrie TJ (ed) Q fever, vol 1, The disease. CRC Press, Boca Raton.
- McDonough J.A., Newton H.J., Klum S., Swiss R., Agaisse H. Roy C.R. 2013. Host pathways important for *Coxiella burnetii* infection revealed by genome-wide RNA interference screening. *MBio*. 4: e00606-12.
- Million M. Raoult D. 2015. Recent advances in the study of Q fever epidemiology, diagnosis and management. *J. Infect.* 71(Suppl. 1): S2–S9.
- Mokrani N., Parola P., Tebbal S., Dalichaouche M., Aouati A., Raoult D. 2008. *Rickettsia aeschlimannii* infection. Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 14 : 1814–1815.
- Moos A., Hackstadt T. 1987. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect Immun*. 55:1144–1150.
- Mura A., Masala G., Tola S., Satta G., Fois F., Piras P., Rolain J.M., Raoult D., Parola P. 2008. First direct detection of rickettsial pathogens and a new rickettsia, '*Candidatus Rickettsia barbariae*', in ticks from Sardinia, Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 : 1028–1033.
- Musso D. et Raoult D. 1997. "Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*," *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 4(2):208–212.
- Nicollet P., Valognes A. 2007. Current review of Q fever diagnosis in animals. *Bull De L Acadm Vet De France* 160: 289-295.

Norlander L. 2000. Q fever epidemiology and pathogenesis. *Microbes and infection*, 2:417-424.

OIE. 2005. Manuel terrestre de l'OIE, Chapitre 2.2.10: 433–445.

OIE. 2010. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Q fever, World Organisation for Animal Health, Chapter 2.1.12:1-13, ISBN 978-92-9044-718-4.

Omsland A., Heinzen R.A. 2011. Life on the outside: the rescue of *Coxiella burnetii* from its host cell. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 111–128.

Omsland A., Beare P.A., Hill J., Cockrell D.C., Howe D., Hansen B., Samuel J.E., Heinzen R.A. 2011b. Isolation from animal tissue and genetic transformation of *Coxiella burnetii* are facilitated by an improved axenic growth medium. *Appl Environ Microbiol.* 77:3720–3725.

Omsland A., Cockrell D.C., Howe D., Fischer E.R., Virtaneva K., Sturdevant D.E. 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 4430–4434.

Oporto B., Barandika J.F., Hurtado A., Aduriz G., Moreno B., García-Pérez A.L. 2006. Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in northern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078: 498-501.

Oteo J.A., Portillo A., Blanco J.R., Ibarra V., Pérez-Martínez L., Izco C., Pérez-Palacios A., Jiménez S. 2005. Low risk of developing human *Rickettsia aeschlimannii* infection in the north of Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063: 349–351.

Papa A., Xanthopoulou K., Kotriotsiou T., Papaioakim M., Sotiraki S., Chaligiannis I., Maltezos E. 2016. *Rickettsia* species in human-parasitizing ticks in Greece. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110: 299–304.

Parker N.R., Barralet J.H., Bell A.M. 2006 Q fever. *Lancet.* 367: 679- 688.

Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E., Raoult D. 2013. Update on tickborne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26 : 657–702.

Petit V. 2003. Fièvre Q (*Coxiella burnetii*) et élevage ovin allaitant dans le département des Bouches du Rhône : enquête épidémiologique. Thèse de Doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 156p.

Pierrou M., Mimoune G., Vastel G. 1956. Une importante épidémie de fièvre Q (175 cas) observée à Batna (Algérie). *Presse. Med.* 64: 471–473.

Porter S.R., Czaplicki G., Mainil J., Guatteo R., Saegerman C. 2011. Q fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *Int. J. Microbiol.* 2011 : 248418.

Portier A., Vollenweider P., Grestle E. 1948. Sur un cas de Q fever (rickettsiose de Burnet-Derrick). *Alger Medicale*. 51 :168–71.

Portillo A., Santibáñez S., García-Álvarez L., Palomar A.M., Oteo J.A., 2015. Rickettsioses in Europe. *Microbes Infect*. 17: 834–838.

Psaroulaki A., Hadjichristodoulou C., Loukaides F., Soteriades E., Konstantinidis A., Papastergiou P., Ioannidou M.C., Tselentis Y. 2006. Epidemiological study of Q fever in humans, ruminant animals, and ticks in Cyprus using a geographical information system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 25: 576-586.

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. 1994. Bacterial pathogens: microscopy, culture and identification. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limited. 21–30.

Raghavan R., Hicks L.D., Minnick M.F. 2008. Toxic introns and parasitic intein in *Coxiella burnetii*: legacies of a promiscuous past. *J Bacteriol*. 190:5934–5943.

Rahal K., Bennadji A., Dahmani A., Dechicha A., Khaled H., Merdja S. 2011. ‘Séroprévalence apparente de la Brucellose, Chlamydieuse et fièvre Q chez les ovins de la région de Ksar Boukhari’, *Recueil 4èmes Journées Vétérinaires de Blida* 4 : 1–16.

Rahal M., Tahir [D.](#), [Eldin C.](#), [Bitam I.](#), [Raoult D.](#), [Parola P.](#) 2018. Genotyping of *Coxiella burnetii* detected in placental tissues from aborted dairy cattle in the north of Algeria. [Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases](#). 57: 50-54.

Raoult D., Laurent J.C., Mutilod M. 1994. Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues. *American Journal of Clinical Pathology*. 101: 318–320.

Raoult D., Marrie T., Mege J. 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. *The Lancet infectious diseases*. 5:219-26.

Raoult D., Tissot-Dupont H., Foucault C., Gouvernet J., Fournier P.E., Bernit E. 2000. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine (Baltimore)*. 79: 109–123.

Raoult D., Vestris G., Enea M. 1990. Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 2482-2484.

Regnery R.L., Spruill C.L., Plikaytis B.D., 1991. Genotypic identification of *rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*, 173:1576-1589.

Rey D., Obadia Y., Tissot-Dupont H., Raoult D. 2000. Seroprevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among pregnant women in south eastern France. *Eur J Obstet-Gynecol-Reprod Biol*. 93:151–6.

- Rjeibi M.R., Darghouth M.A., Gharbi M. 2016a. Prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in Tunisian sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 83(1): (a 1040).
- Rjeibi M.R., Darghouth M.A., Rekik M., Amor B., Sassi L., Gharbi M. 2016b. First molecular identification and genetic characterization of *Theileria lestoquardi* in sheep of the Maghreb region. *Transbound. Emerg. Dis.* 63: 278–284.
- Rodolakis A., Berri M., Héchard C., Caudron C., Souriau A., Bodier C.C., Blanchard B., Camuset P., Devillechaise P., Natorp J.C., Vadet J.P. Arricau-Bouvery N. 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of Dairy Science.* 90: 5352- 5360.
- Rodolakis A., Berri M., Rekiki A. 2004. Le point sur le diagnostic et la prevention de la chlamydie et la fièvre Q Journée nationales GTV, Tours, 751-754.
- Rodolakis A., Salinas J., Papp J. 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res.* 29: 275–288.
- Roest H.I.J., Tilburg J.J.H.C., Van Der Hoek W., Vellema P., Van Zijderveld F.G., Klaassen C.H.W., Raoult D., 2011. The Q fever epidemic in the Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol. Infect.* 139, 1–12 (1).
- Roest H.J., van Gelderen B., Dinkla A., Frangoulidis D., van Zijderveld F.G., Rebel J., van Keulen L. 2012. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* 7: 14.
- Rousset E. B., Durand J. L., Champion. 2009. Efficiency of a phase 1 vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd,” *Clinical Microbiology and Infection.* 15(2): 188–189.
- Rousset E., Durand B., Berri M., Dufour P., Prigent M., Russo P., Delcroix T., Touratier A., Rodolakis A., Aubert M. 2007. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet. Microbiol.* 124 : 286-297.
- Roux V., Fournier P.E., Raoult D. 1996. Differentiation of spotted fever group *rickettsia* by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol.* 34 :2058-2065.
- Ruiz-Fons F., Rodríguez O., Torina A., Naranjo V., Gortázar C. 2008. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet. Microbiol.* 126: 282-286.
- Salamand A., Collart F., Caus T. 2002. Q fever endocarditis: over 14 years of surgical experience in referral centre for rickettsioses. *J Heart Valve Dis.* 11: 84-90.
- Samuel J.E., Frazier M.E., Mallavia L.P. 1985. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 49:775–779.

Samuel, J.E., Hendrix L.R. 2009. Laboratory maintenance of *Coxiella burnetii*. *Current Protocols in Microbiology*. 6(15):1–16.

Sanchez J., Souriau A., Buendia A.J., Arricau-Bouvery N., Martinez C.M., Salinas J., Rodolakis A., Navarro J.A. 2006. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *J. Comp. Pathol.* 135 (2-3), 108–115.

Savinelli E.A., Mallavia L.P. 1990. Comparison of *Coxiella burnetii* plasmids to homologous chromosomal sequences present in a plasmid less endocarditis-causing isolate. *Ann NY Acad Sci.* 590:523–533.

Scott G.H., Williams J.C., Stephenson E.H. 1987. Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *Journal of General Microbiology*. 133: 691–700.

Seshadri R., Paulsen I.T., Eisen J.A., Read T.D., Nelson K.E., Nelson W.C. 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 5455–5460.

Sidi-Boumedine K., Rousset E., Henning K., Ziller M., Niemczuck K., Roest H.I.J., Thiéry R. 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. *EFSA Scientific Report on Question No EFSA-Q-2009-00511*: 1-48.

Skultety L., Toman R., Patoprsty V. 1998. A comparative study of lipopolysaccharides from two *Coxiella burnetii* strains considered to be associated with acute and chronic Q fever. *Carbohydr Polym* 35:189–194.

Socolovschi C., Reynaud P., Kernif T., Raoult D., Parola P. 2012. *Rickettsiae* of spotted fever group, *Borrelia valaisiana*, and *Coxiella burnetii* in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. *Ticks Tick. Dis.* 3: 355–360.

Stein A., Raoult D., 1995. Q fever endocarditis. *Eur Heart J*,16(B): 19-23.

Stein A., Raoult, D. 1998. Q fever during pregnancy: a public health problem in southern France. *Clin Infect Dis.* 27: 592-6.

Stein A., Saunders N.A., Taylor A.G., Raoult D. 1993. Phylogenic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.*113: 339– 344.

Stuen S., Longbottom D., 2011. Treatment and control of chlamydial and rickettsial infections in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27 (1): 213–233.

Svraka S., Toman R., Skultety L., Slaba K., Homan W.L. 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiology Letters.* 254: 268–274.

Taoudi N. D., Maslin J., Dubrous P. h., Garnotel E. 2004. Apports et limites des sérologies bactériennes en pathologie infectieuse. *Revue Française des Laboratoires*. 366 : 37-43.

Thiele D., Karo M., Krauss H. 1992. Monoclonal antibody-based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens. *European Journal of Epidemiology*. 8:568–574.

Thiele D., Willems H. 1994). Is plasmid-based differentiation of *Coxiella burnetii* in ‘Acute’ and ‘Chronic’ isolates still valid? *Eur J Epidemiol*. 10:427–434.

Thompson H.A., Hoover T.A., Vodkin M.H., Shaw E.I. 2003. Do chromosomal deletions in the lipopolysaccharide biosynthetic regions explain all cases of phase variation in *Coxiella burnetii* strains? *Ann NY Acad Sci*. 990:664–670.

Tiggert W.D., Benenson, A.S., 1956. Studies on Q fever in man. *Trans.Assoc. Am. Phys*. 69: 98–104.

Tissot-Dupont H., Amadei M.A., Nezri M. 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis*. 10:1264–1269.

Toman R., Kazar J. 1991. Evidence for the structural heterogeneity of the polysaccharide component of *Coxiella burnetii* strain Nine Mile lipopolysaccharide. *Acta Virol*. 35:531–537.

Tujulin E., Macellaro A., Lilliehook B., Norlander. 1998. L. Effect of endocytosis inhibitors on *Coxiella burnetii* interaction with host cells. *Acta Virol*. 42: 125–131.

Van den Brom R., Schimmer B., Schneeberger P.M., Swart W.A., van der Hoek W., Vellema P., 2013b. Seroepidemiological survey for *Coxiella burnetii* antibodies and associated risk factors in Dutch livestock veterinarians. *PLoS One* 8 (1): e54021.

van Schaik E.J., Chen C., Mertens K., Weber M.M., Samuel J.E. 2013. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat. Rev. Microbiol*. 2: 561-573.

Vanegas A., Keller C., Krüger A., Manchang T.K., Hagen R.M., Frickmann H., Veit A., Achukwi M.D., Krücken J., Poppert S. 2018. Molecular detection of spotted fever group *rickettsiae* in ticks from Cameroon. *Ticks Tick. Dis*. 9: 1049–1056.

Vardi M., Petersil N., Keysary A., Rzotkiewicz S., Laor A., Bitterman H. 2011. Immunological arousal during acute Q fever infection,” *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 30: 1527–1530.

Vishwanath S., Hackstadt T. 1988. Lipopolysaccharide phase variation determines the complement-mediated serum susceptibility of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 56:40–44.

Waag D. M. 2007. *Coxiella burnetii*: host and bacterial responses to infection,” *Vaccine*. 25:7288–7295.

Welsh H. H., Lennette E H., Abinanti F R., Winn J.F. 1957. Air-borne transmission of Q fever: the role of parturition in the generation of infective aerosols. *Ann NY Acad Sci.* 70: 528-35.

Willems H., Ritter M., Jager C., Thiele D. 1997. Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmid less *Coxiella burnetii* Scurry Q217. *J Bacteriol.* 179:3293–3297.

Willems H., Thiele D., Frölich-Ritter R., Krauss H. 1994. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Zentralbl Veterinar med B.* 41 :580-7.

Williams J.C. 1991. Infectivity, virulence, and pathogenicity of *Coxiella burnetii* for various hosts. In: Williams JC, Thompson HA (eds) Q fever: the biology of *Coxiella burnetii*. CRC Press, Boca Raton

Woernle H., Limouzin C., Muler K., Durand M. P., 1985. La fièvre Q bovine. Effet de la vaccination et de l'antibiothérapie sur l'évolution clinique et l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans le lait. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France.* 58 : 91–100.

Yahiaoui W.I., Afri-Bouzebda F., Bouzebda Z., Dahmani A. 2013. 'Sondage sérologique de la fièvre Q chez les ovins par la méthode ELISA et prévalence des avortements dans la région de Ksar El Boukhari (Algérie). *TROPICULTURA* 32(1) : 22–27.

Zamboni D.S., Mortara R.A., Freymuller E., Rabinovitch M. 2002. Mouse resident peritoneal macrophages partially control in vitro infection with *Coxiella burnetii* phase II. *Microbes Infect* 4:591–598.

Zhang G. Q., Samuel J. E. 2003. Identification and cloning potentially protective antigens of *Coxiella burnetii* using sera from mice experimentally infected with nine mile phase I. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 990 :510– 520.

ANNEXES

Annexe 1 :

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE

Plan « Avortements chez les petits ruminants »

Fiche de commémoratifs

N° cheptel :

Nom et adresse de l'éleveur :

Nom du vétérinaire :

Renseignements sur l'élevage :

Type d'élevage : ovine mixte (ovin, caprin, bovin)

La race : Ouled Djellal Rumbi Hamra Croisé

Système d'élevage : Intensif Extensif Semi-extensif

Transhumance : Oui Non

Contact avec d'autres cheptels ovins : Jamais Pat communs Pat voisins

Contact avec faune sauvage ? Impossible Possible Observé

Nombre de femelles du troupeau reproducteur :

Conduite du troupeau et alimentation :

Achats à l'extérieur : Oui Non

Reproduction : Toute l'année Saisonnière

Type de reproduction : Monte naturelle Synchronisation

Mise-bas dans des cases spécifiques ? Oui Non

Vaccination : Oui Non

Si oui contre quelle(s) maladie(s) :

Traitement contre les tiques : Oui Non

Ration équilibrée (fourrage + céréales + compl. Azoté) Oui Non

Distribution régulière de minéraux (Ca & P) Oui Non

Signes associés aux avortements (femelles ayant avorté ou troupeau en général :

Avorton :

Agneaux chétifs à la naissance : Oui Non

Fœtus momifié : Oui Non

Nécrose placentaire : Oui Non

Mortinatalité : Oui Non

Troubles nerveux (jeunes / adultes) : Oui Non

Femelle ayant avorté :

Stade de gestation au moment des avortements

1^{ère} moitié 2^{ème} moitié indifférent

Age des femelles ayant avorté : jeunes (<2 ans) âgées (>5 ans) tous âges

Date de début des avortements : / / 20

Nb d'avortements à ce jour (ou de femelles ayant des produits morts à 72h) :

Fièvre et dégradation de l'état général suite avortement : Oui Non

Mérite Oui Non

Ictère Oui Non

Mammites Oui Non

Autres signes (jeunes ou adultes)

Préciser

.....

.....

Facteurs de risque potentiels :

Maladie(s) infectieuse(s) ou parasitisme connue sur l'élevage : Oui Non

(Préciser)

:

.....

Depuis quand ? (*Année*).....

Dans les 6 derniers mois, introduction d'animaux d'(un) autre(s) cheptel (s) ou fusion de cheptels : Oui Non

Origine de l'eau de boisson : réseau puits ou forage réserve en surface

Qualité bactériologique de l'eau de boisson : contrôlée et satisfaisante non contrôlée

Ouverture d'un nouveau silo avant les avortements ? Oui Non

Défaut de conservation des fourrages (moisissures) ? Oui Non

La signature du vétérinaire

Annexe 2 :

Le tableau d'identification des tiques collectés sur les bovins

Région	La date	N° de cheptel	N° de tique	Espèce de tique	Engoré ou non
Sidi belabbes	6/7/2017	I	1	<i>H, Excavatum</i> Male	Non engoré
Sidi belabbes	6/9/2017	II	1	<i>Rh sanguineus</i> female	Non engoré
			2	<i>Rh sanguineus</i> male	Non engoré
Sidi belabbes	6/13/2017	III	1	<i>Rh sanguineus</i> female	engoré
			2	<i>Rh sanguineus</i> male	Non engoré
Saida	9/14/2017	IV	1	<i>H, Excavatum</i> femelle	Engoré
			2	<i>Rh bursa</i> female	Engoré
			3	<i>Rh bursa</i> female	Non engoré
			4	<i>Rh bursa</i> female	Non engoré
Sidi belabbes	6/19/2017	V	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engoré
			2	<i>Rh bursa</i> male	Non engoré
			3	<i>H, Excavatum</i> Male	Non engoré
			4	<i>Rh bursa</i> female	Engoré
			5	<i>Rh bursa</i> male	Non engoré
			6	<i>Rh bursa</i> male	Non engoré
			7	<i>Rh bursa</i> male	Non engoré
			8	<i>Rh bursa</i> male	Non engoré
			9	<i>Rh bursa</i> male	Non engoré
			10	<i>Rh bursa</i> male	Non engoré
Saida	6/24/2017	VI	1	<i>H, Excavatum</i> femelle	Engoré
			2	<i>H, Excavatum</i> femelle	Engoré
			3	<i>H, Excavatum</i> male	Non engoré
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engoré
			5	<i>H, Excavatum</i> femelle	Engoré
Saida	6/25/2017	VII	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engoré

			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			3	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			5	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Sidi belabbes	7/6/2017	VIII	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			3	<i>H, marginatum</i> femelle	Engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			5	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Saida	7/10/2017	IX	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			3	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Sidi belabbes	7/25/2017	X	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			3	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			5	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			6	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Sidi belabbes	7/27/2017	XI	1	<i>H, marginatum</i> femelle	Engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Saida	8/4/2017	XII	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			3	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			5	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Saida	17-Aug	XIII	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé

			3	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			5	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Sidi belabbes	9/3/2017	IVX	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			3	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			5	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			6	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Sidi belabbes	9/7/2017	VX	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			3	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			5	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Saida	9/9/2017	VIX	1	<i>H, Excavatum</i> female	Engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> female	Engorgé
			3	<i>H, Excavatum</i> female	Engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> female	Engorgé
			5	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			6	<i>H, Excavatum</i> female	Engorgé
			7	<i>H, Excavatum</i> female	Non engorgé
			8	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
Saida	9/10/2017	VIIX	1	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			2	<i>H, Excavatum</i> male	Non engorgé
			3	<i>H, Excavatum</i> female	Non engorgé
			4	<i>H, Excavatum</i> female	Non engorgé

Annexe 3 :

Tableau d'identification des tiques récoltés sur les ovins :

Région	La date	N° DE CHEPTEL	N° DE TIQUE	Espèce de tique	Engorgé ou non
Sidi Belabbes	6/3/2017	I	1	<i>Hy excavatum</i> femelle	Engorgé
			2	<i>Hy marginatum</i> femelle	Engorgé
			3	<i>Hy excavatum</i> femelle	Non engorgé
Sidi Belabbes	6/5/2017	II	1	<i>Rh bursa</i> femelle	Engorgé
			2	<i>Rh bursa</i> femelle	Engorgé
			3	<i>Rh bursa</i> femelle	Engorgé
			4	<i>Rh bursa</i> male	Non engorgé
			5	<i>Rh bursa</i> femelle	Non engorgé
			6	<i>Rh bursa</i> male	Non engorgé
			7	<i>Hy marginatum</i> male	Non engorgé
Sidi Belabbes	6/9/2017	III	1	<i>Rh bursa</i> femelle	Engorgé
			2	<i>Rh bursa</i> femelle	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa</i> male	Non engorgé
			4	<i>Rh bursa</i> femelle	Engorgé
			5	<i>Rh bursa</i> male	Non engorgé
Sidi Belabbes	9/16/2017	IV	1	<i>Rh bursa</i> femelle	Non engorgé
			2	<i>Rh bursa</i> femelle	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa</i> femelle	Engorgé
			4	<i>Rh bursa</i> male	Non engorgé
Saida	6/22/2017	V	1	<i>Hy excavatum</i> femelle	Engorgé
			2	<i>Hy excavatum</i> femelle	Engorgé
			3	<i>Hy excavatum</i> femelle	Engorgé
			4	<i>Hy excavatum</i> femelle	Non engorgé
Sidi Belabbes	04/07/2017	VI	1	<i>Rh bursa</i> femelle	Engorgé

			2	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			4	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
Sidi Belabbes	7/12/2017	VII	1	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
			2	<i>Hy excavatum femelle</i>	Engorgé
			3	<i>Hy excavatum male</i>	Non engorgé
			4	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
			5	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
Saida	7/17/2017	VIII	1	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
			2	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			4	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			5	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
Saida	7/19/2017	IX	1	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
			2	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
			4	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			5	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
Sidi Belabbes	7/28/2017	X	1	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
			2	<i>Hy lusitanicum male</i>	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			4	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
Saida	8/5/2017	XI	1	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			2	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			4	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			5	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			6	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé

Sidi Belabbes	9/3/2017	XII	1	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			2	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			4	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			5	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			6	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
Sidi Belabbes	9/8/2017	XIII	1	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
			2	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			4	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			5	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			6	<i>Rh bursa femelle</i>	Engorgé
			7	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			8	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
			9	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé
Saida	9/9/2017	IVX	1	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			2	<i>Rh bursa femelle</i>	Non engorgé
			3	<i>Rh bursa male</i>	Non engorgé

Annexe 4 :

MATERIEL UTILISE DANS LES TECHNIQUES SEROLOGIQUES

1 : Matériel pour prélèvement de sang et recueil de sérums

- Tubes secs Vacutainer®.
- Aiguilles à prélèvement sanguin Vacutainer®.
- Porte aiguilles.
- Alcool chirurgical.
- Gants.
- Cotton.
- Glacière avec pains de glace.
- Centrifugeuse (2000 x g).
- Tubes à centrifuger et microtubes Eppendorf.

2 : Matériel pour les tests de type ELISA

- Micropipette de précision mono et multicanaux capables de délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl, 200 µl.
- Embouts de pipette à usage unique.
- Cylindres gradués.
- Portoir pour tubes.
- Réservoir à réactifs pour pipettes multicanaux.
- Couvercle.
- Microplaque de prédilution.
- Adhésifs pour microplaques.
- Agitateur type vortex.
- Eau distillée.
- Trousse ELISA *Neospora caninum* (Bio-X Diagnostics, Belgique).
- Kit ELISA indirecte LSIVET RUMINANT MILK/SERUM Q FEVER (LSI, France).
- Kit ELISA indirecte LSIVET RUMINANT SERUM CHLAMYDIOSIS (LSI, France).
- Incubateur de microplaques (37°C ± 2°C).
- Lecteur ELISA pour microplaques à 96 puits équipé d'un filtre à 450 nm (ELx800TM, Biotek®).