

République Algérienne Démocratique et
Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et la
Recherche Scientifique

École Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THÈSE

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

Thème :

Diagnostic et épidémio-surveillance des avortements d'origine infectieuse chez la vache dans la région d'Alger

Présentée par : **Mme DIMERDJI DERDOUR Salima Yamina**

Les membres du jury :

Président :	Pr D. KHELEF	Professeur	ENSV
Promotrice :	Pr F. GHALMI	Professeur	ENSV
Examineur :	Pr T.K. BOUKHORS	Professeur	ENSV
Examineur :	Pr R. KAÏDI	Professeur	I.S.V Blida1
Examineur :	Pr R. TRIKI YAMANI	Professeur	I.S.V Blida1

Année universitaire : 2018-2019

DEDICACES

A mes parents.

A ma sœur.

A ma famille.

A mes amis qui se reconnaîtront.

A Monsieur le Professeur L. GUEZLANE qui a été à l'initiative de ce travail. Respectueuse affection.

A Monsieur le Professeur B. CHINA qui m'a été d'une si grande aide, disponibilité et compétence et tout cela avec humour et sérénité. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur A.L. PARODI, mon Maître, qui m'a tellement soutenue, aidée et entourée d'une réelle affection paternelle.

A mes collègues et amies : N. AZZAG, R. BOUABDALLAH, F. GHALMI, F. HAFSI, A. LAAMARI et S. TENNAH pour leur amitié profonde et sincère, pour tous les « moments » difficiles que nous avons traversés et qui ont soudés notre affection. Leur implication et dévouement sont irremplaçables et inestimables.

A Monsieur R. KADDOUR du laboratoire d'anatomie pathologique de l'ENSV, qu'il soit remercié pour sa coopération.

REMERCIEMENTS

Je me permets d'exprimer ma reconnaissance et mon respect à :

- Madame le Professeur **F. GHALMI** pour son dévouement, sa rigueur, ses exigences, son aide si précieuse et déterminante pour la réalisation de ce travail. Sa générosité, sa disponibilité, ses qualités ô combien rares ont été essentielles. Puisse-t-elle trouver toute notre gratitude et notre profonde affection.
- Monsieur le Professeur **D. KHELEF** qui a accepté sans aucune hésitation la présidence ce jury. Qu'il soit éternellement remercié.
- Madame le Professeur **T.K. BOUKHORS** d'avoir bien voulu examiner ce travail. Hommages respectueux.
- Monsieur le Professeur **R. KAÏDI** d'avoir accepté de faire partie de notre jury. Qu'il soit assuré de notre vive gratitude.
- Monsieur le Professeur **R.R. TRIKI YAMANI** de bien vouloir juger cette thèse. Qu'il soit assuré de notre vive reconnaissance et dévouement.

Résumé

Les avortements chez la vache sont responsables de pertes économiques importantes pour les éleveurs. Les causes infectieuses (virus, bactéries, parasites...) sont responsables de plus de la moitié de ces avortements dans le monde. Ce projet de thèse vise à étudier la situation des avortements dans les fermes de bovins laitiers de la région d'Alger. Il s'agit de réaliser une enquête épidémiologique sur base d'un questionnaire afin de séparer les fermes cas (vaches ayant avorté) des fermes témoins (vaches n'ayant jamais avorté) et ensuite de réaliser différents prélèvements sur un échantillon représentatif pour une mise en évidence éventuelle de différents agents infectieux (*Neospora caninum*, *Tritrichomonas foetus*, *bovine herpes virus 1*, *bovine herpes virus 4*, *BVD virus*, *Brucella abortus*, *Salmonella enterica* Seroovar *dublin*, *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter fetus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydophila abortus*) pouvant être à l'origine des avortements. Un total de 360 vaches (278 n'ayant pas avorté et 82 ayant avorté) a été analysé afin de les identifier. La prévalence variait de 0% pour *Tritrichomonas foetus* à 15% pour *Neospora caninum*. En outre, une étude cas-témoin a été menée pour rechercher une association entre la présence du pathogène et l'existence d'avortement chez les vaches. Les odds ratios calculés ont été significatifs pour *bovine herpes virus 4*, *BVD virus*, *Brucella abortus*, *Salmonella dublin*, *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* et *Coxiella burnetii*.

Dans la présente étude, l'histologie et l'immunohistochimie ont été appliquées pour le diagnostic d'une éventuelle infection fœtale. Six avortons bovins ont été collectés et examinés. Les organes prélevés étaient, le cerveau, le cœur et le foie. Un avorton sur les six prélevés s'est montré positif à l'histopathologie (16,66%). Nous avons noté des lésions microscopiques au niveau du cerveau consistant en une encéphalite non suppurée multifocale ainsi que des foyers nécrotiques entourés par un bord de cellules inflammatoires microgliales et mononucléées. Une myocardite focale ou diffuse et une nécrose hépato-cellulaire des infiltrats inflammatoires mononucléaires ont été également observées chez le même fœtus. Les lésions observées étaient compatibles avec l'infection à *N. caninum* notamment dans le cerveau. L'immunohistochimie a révélé dans le cerveau des antigènes de *N. caninum* situés généralement dans des foyers d'encéphalite, indépendamment de la présence de nécrose. Un kyste à bradyzoïte de *Neospora caninum*, sans lésions associées, a aussi été identifié ainsi que des tachyzoïtes isolés ou en grappes. Dans le myocarde, les tachyzoïtes de *Neospora caninum* ont été identifiés, principalement à l'intérieur des fibres du myocarde associé à des infiltrats ou à des zones de nécrose. Dans le foie, des tachyzoïtes de *N. caninum*, isolés ou en grappes, ont été également identifiés.

En conclusion, ce travail suggère que l'impact des agents infectieux en termes d'avortements au sein du cheptel bovin laitier est non négligeable dans la région d'Alger et indique que *N. caninum* doit être considéré comme une cause importante d'avortement.

Mots clés : avortement, bovin, région d'Alger, agents infectieux

Summary

Abortions in cows are responsible for significant economic losses for farmers. Infectious causes (viruses, bacteria, parasites...) are responsible for more than half of these abortions worldwide. This thesis project aims to study the situation of abortions on dairy cattle farms in the Algiers region. The aim is to carry out an epidemiological survey on the basis of a questionnaire in order to separate the case farms (cows with abortions) from the control farms (cows that never had aborted) and then to carry out various samples on a representative sample for a given possible evidence of different infectious agents (*Neospora caninum*, *Tritrichomonas fetus*, *Bovine Herpes virus 1*, *Bovine Herpes virus 4*, *BDV virus*, *Brucella abortus*, *Salmonella enteritica* sérovar *dublin*, *Leptospira interrogans* sérovar *hardjo*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter fetus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydophyla abortus*) that can causes abortions. A total of 360 cows (278 having not aborted and 62 having aborted) were analyzed for identification. The prevalence ranged from 0% for *Tritrichomonas fetus* to 15% for *Neospora caninum*. In addition, a case-control study was conducted to investigate an association between the presence of the pathogen and the existence of abortion in cows. The calculated odds ratios were significant for *Bovine Herpes virus 4*, *BDV virus*, *Brucella abortus*, *Salmonella dublin*, *Leptospira interrogans* sérovar *hardjo* and *Coxiella burnetii*.

In this study, histology and immunohistochemistry were applied for the diagnosis of possible fetal infection. Six bovine abortions were collected and examined. The organs removed were the brain, the heart and the liver. One out of six sampled was positive for histopathology (16,66%). We noted microscopic lesions in the brain consisting of multifocal non-suppurative encephalitis and necrotic foci surrounded by an edge of microglia and mononuclear inflammatory cells. Focal of diffuse myocarditis and hepatocellular necrosis of mononuclear inflammatory infiltrates were also observed in the same fetus. The lesions observed were compatible with *Neospora caninum* infection, particularly in the brain.

Immunohistochemistry revealed *Neospora caninum* antigens in the brain, usually in foci of encephalitis, independently of the presence of necrosis. A bradizoite cyst of *Neospora caninum*, without associated lesions, has also been identified, as well as isolated or clustered tachyzoides. In the myocardium, tachyzoides of *N. caninum* have been identified, mainly within myocardial fibers associated with infiltrates or areas of necrosis. In the liver, *N. caninum* tachyzoides, isolated or in clusters, have also been identified.

In conclusion, this work suggests that the impact of infectious agents in terms of abortions within the dairy cattle herd is not negligible in the region of Algiers and indicates that *N. caninum* should be considered as an important cause of abortion.

Key words: abortion, cattle, Algiers region, infectious agents.

ملخص

الإجهاض في الأبقار هي المسؤولة عن خسائر اقتصادية كبيرة لمربي الماشية. الأسباب المعدية (الفيروسات والبكتيريا والطفيليات...) مسؤولة عن أكثر من نصف حالات الإجهاض في جميع أنحاء العالم. هذه الأطروحة يهدف المشروع إلى دراسة حالة الإجهاض في مزارع الأبقار الحلوب في الجزائر المنطقة. والهدف من ذلك هو إجراء المسح الوبائي على أساس استبيان من أجل فصل قضية مزارع (إحباط الأبقار) من السيطرة على مزارع (الأبقار التي لم إحباط) ثم أخذ عينات مختلفة من عينة تمثيلية من الجنين البقري فيروس (*Neospora caninum*, *Tritrichomonas*) أجل إمكانية الكشف عن مختلف العوامل المعدية. دبلن ، Serovar الفيروس ، البروسيل الإجهاض ، السالمونيلا الملتهبة BVD ، الهربس 1 ، البقري فيروس الهربس 4 serovar دبلن ، الليستيريا Serovar الليستريه المستوحدة ، السالمونيلا الملتهبة ، *serovar hardjo* الاستفهامية البريمية يمكن أن يكون (الإجهاض *Coxiella burnetii*, *Chlamydophila* الليستريا المستوحدة ، العطيفة الجنين ، *hardjo* ، غير المجهضة 82 إحباط) تم تحليلها لتحديد الهوية 278 الأبقار (360 سبب الإجهاض. ما مجموع

بالإضافة إلى دراسة حالة *Neospora caninum* %الجنين إلى 15 *Tritrichomonas* %انتشار تراوحت بين 0 أجريت للتحقيق في وجود ارتباط بين وجود المرض وجود الإجهاض في الأبقار. احتمالات نسب تحسب كانت كبيرة الفيروس ، البروسيل الإجهاض ، السالمونيلا دبلن ، الاستفهامية البريمية BVD ، بالنسبة البقري فيروس الهربس 4 *serovar hardjo* و *Coxiella burnetii*.

في هذه الدراسة، علم الأنسجة المناعية تم تطبيق لتشخيص احتمال إصابة الجنين. ستة البقري الإجهاض تم جمعها وفحصها. أجهزة إزالة كانوا الدماغ والقلب والكبد . واحد من أصل ستة إحباط اختبار عينات إيجابية من أجل التشريح المرضي (16.66%). وجدنا الآفات المجهرية في الدماغ تتكون من البؤر غير معتمد التهاب الدماغ و بؤر نخرية وتحيط بها الحدود الدبقية و وحيدات النوى الخلايا الالتهابية. التنسيق أو منتشر التهاب عضلة القلب و الكبد الخلوي نخر وحيدات العدوى ، خاصة في الدماغ *N. caninum* النوى تتسرب التهابات لوحظت أيضا في نفس الجنين. الآفات لوحظ تتفق مع

المستضدات في الدماغ ، وعادة ما تقع في الدماغ المواقع ، بغض النظر عن وجود نخر. أ *N. caninum* المناعية كشفت ، مع عدم المرتبطة الآفات، كما تم تحديد فضلا عن عزل أو متفاوت *Neospora caninum* الكيس من *bradyzoites* تم تحديدها أساسا في ألياف عضلة القلب *Neospora caninum tachyzoites* ف عضلة القلب ، *tachyzoites* . وحددت أيضا في الكبد *N. caninum tachyzoites* المرتبطة تتسرب أو مناطق النخر. معزولة متفاوت

في الختام هذا العمل يشير إلى أن تأثير العوامل المعدية في أحكام الإجهاض في الأبقار الحلوب السكان لا يستهان بها في المنطقة الجزائ يشير إلى أن. ينبغي أن يعتبر *N. caninum* أحد أهم أسباب الإجهاض

الكلمات الرئيسية: الإجهاض ، الماشية ، الجزائر المنطقة ، العوامل المعدية

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE	4
Étiologie des avortements bovins : causes non infectieuses et causes infectieuses	5
I. Causes non infectieuses	5
1. Traumatismes et bâtiments	5
2. Causes iatrogènes	5
3. Intoxications	6
4. Autres causes abortives non infectieuses	7
II. Causes infectieuses d'avortement	8
1. Agents bactériens	8
2. Agents viraux	25
III. Les protozoaires à l'origine d'avortements bovins	33
<i>Neospora caninum</i>	33
<i>Tritrichomonas foetus</i>	37
IV. Diagnostic des causes d'avortements d'origine infectieuse	39
<i>Brucella abortus</i>	39
<i>Coxiella burnetii</i>	41
<i>Salmonella</i>	43
<i>Chlamydomphila abortus</i>	46
<i>Leptospira</i>	48
<i>Listeria</i>	57
<i>Campylobacter</i>	59
Le virus du BVDV	61
Herpes virus bovin de type 1 (BHV1)	68
Herpes virus bovin (BHV de type 4)	71
Le virus de Schmallenberg	72
<i>Neospora caninum</i>	74

<i>Trichomonas foetus</i>	76
V. Lésions observées chez l'avorton en fonction de l'agent infectieux	78
VI. Impact économique des avortements	81
II. Matériel et méthodes	86
II.1 Description de la région étudiée	87
II.2 Description de l'élevage bovin	88
II.3 Plan d'échantillonnage et enquêtes épidémiologiques	88
II.3.1. Établissement de questionnaire épidémiologique	88
II.3.2. Récolte de différents échantillons	89
II.4. Analyses de laboratoire.....	90
1- Récolte du sérum	90
2- Mise en culture des matières fécales	90
3- Mise en culture des écouvillonnages vaginaux, placenta des vaches ayant avorté et du contenu stomacal, foie, rate, cerveau et cœur des avortons bovins	90
4- Examen Histopathologique (avorton et placenta)	91
5- Analyses moléculaires	95
II.5. Analyses statistiques	96
Odds ratio (OR)	96
Fraction attribuable chez les exposés ou fraction étiologique de risque	97
Fraction attribuable dans la population ou fraction étiologique de risque dans la population	97
III. RÉSULTATS	99
I. ÉTUDE HISTOLOGIQUE	100
II. ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE	102
III. ANALYSE MOLÉCULAIRE POUR LA DÉTECTION DE <i>Salmonella dublin</i>	103
IV. ÉPIDÉMIOLOGIE DESCRIPTIVE	104
V. ÉPIDÉMIOLOGIE EXPLICATIVE	106
IV. Discussion	109
V. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	118

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122
ANNEXE	140

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AF: fraction attribuable

BGM: Buffalo green monkey

BHK: Baby hamster kidney

BLA: bovin laitier amélioré

BLL : bovin laitier local

BLM : bovin laitier moderne

BoHV1 : herpès virus bovin de type 1

BoHV4 : herpès virus bovin de type 4

BVDV : diarrhée bovine virale

C. abortus : *Chlamydophila abortus*

C. burnetii : *Coxiella burnetii*

C. pecorum : *Chlamydophila pecorum*

C. psittaci : *Chlamydophila psittaci*

CNIAAG : Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique

CP : souche cytopathogène

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FC : Fixation du Complément

FEADER : Fond Européen Agricole pour le Développement Rural

GDS : protocole national de diagnostic différentiel des avortements chez les bovins. 2013.
version 30/01/2013.

GnRH : Gonadotrophine Releasing Hormone

IA : Insémination Artificielle

IBR : rhinotrachéite infectieuse bovine

ICFTU: International Complement Fixation Test Units

IFAT: Indirect Fluorescence Antibody Test

IgG1 et IgM : immunoglobulines G1 et M

IPI : infectés permanents immunotolérants

ISO : International Standard Organization

ITCF : isothiocyanate de fluorescéine

L. hardjo : *Leptospira interrogans* sérovar *hardjo*

L. interrogans : *Leptospira interrogans*

LH : Hormone Lutéinisante

LPS : lipopolysaccharide

MAT : Microscopic Agglutination Test

MD : Maladie des Muqueuses

N. caninum : *Neospora caninum*

NaCl : chlorure de sodium

NCP : souche non cytopathogène

OIE : Organisation Internationale des Epizooties renommée Organisation mondiale de la Santé Animale.

OMPs : les protéines de la membrane externe

OR : Odds ratio

PAF : fraction attribuable dans la population

PCR : Polymérase Chain Réaction

PGF2 α : Prostaglandine F2 α

RAPD : Random Amplification of Polymorphic

RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA

RBT : test au Rose Bengale

RDC : République Démocratie du Congo

RESSAB : Réseau d'Épidémio-Surveillance de la Salmonellose Bovine

RIA : Radio Immuno Assay RIA

SAW : séro-agglutination lente en tubes

S. dublin : *Salmonella enterica* sérovar *dublin*

T. fætus : *Trichomonas fætus*

TMB : tétra méthyl benzidine

TNF : Tumor Necrosis Factor

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : prévalence de *Salmonella.spp* dans les matières fécales des bovins (Hezil, 2014)...p.14

Tableau 2 : prévalence de *Salmonella dublin* dans les matières fécales de vaches (Hezil, 2014)...p.15

Tableau 3 : prévalence *Salmonella dublin* dans le lait (Hezil, 2014)...p.15

Tableau 4 : interprétation des tests sérologiques (Chase *et al.*, 2003)...p.68

Tableau 5 : âge moyen et intervalle de confiance à 95 % des fœtus et vaches mères... p.100

Tableau 6 : prévalence des différents pathogènes étudiés...p. 104

Tableau 7 : vaches présentant une infection multiple...p.105

Tableau 8 : analyse de la relation entre le contact avec un pathogène et l'apparition d'un avortement chez la vache : étude cas-témoin...p.107

Tableau 9 : prévalences observées (%) dans différentes analyses multiples...p.116

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : déroulement d'une infection leptospirosique de manière schématique (Levett, 2001 ; Boibieux, 2012) ... p.20

Figure 2 : avorton de la néosporose (Der Meerschman *et al.*, 2005) ... p.78

Figure 3 : avorton brucellique (2^{ème} moitié de la gestation) (Bazin *et al.*, 1994) ... p. 79

Figure 4 : encéphalite nécrosante focale (coloration à l'hématoxyline et l'éosine, x 100) ...p.100

Figure 5 : zone focale de la nécrose hépatocellulaire (coloration à l'hématoxyline-éosine, x 100) ...p.101

Figure 6 : foyer nécrotique central entouré par des cellules micro-gliales dans le cerveau du fœtus positif (coloration à l'hématoxyline-éosine, x 400) ...p.101

Figure 7 : kyste microscopique de *Neospora caninum* dans le cerveau du fœtus bovin. On note l'absence d'inflammation. (x400) (Amino Ethyl Carbazole avec antisérum à *N. caninum*) ...p. 102

Figure 8 : grappe de tachyzoïtes dans un foyer de nécrose du cerveau du fœtus avorté (200X). Amino Ethyl Carbazole avec antisérum à *N. caninum*...p.102

Figure 9 : amas de tachyzoïtes de *N. caninum* dans le cœur du fœtus bovin (x400) (Amino Ethyl Carbazole avec antisérum à *N. caninum*). ...p.103

Figure 10 : gel d'agarose montrant le résultat positif par la technique PCR pour la détection de *S. dublin*. 1 et 2 *S. dublin*, M : DL2000. Les séquences cibles SeD_A1118, SeD_A2283 et invA, produisant des amplicons de 463 pb, 378 pb et 284 pb, respectivement...p.103

INTRODUCTION

Les avortements sont l'une des principales causes de pertes économiques chez les éleveurs de bovins. En plus de la perte du veau, il faut ajouter une perte de production laitière et les coûts d'entretien de ces animaux non productifs.

On considère comme avortement chez l'espèce bovine, l'expulsion du fœtus ou du veau né mort ou succombant dans les quarante-huit heures qui suivent la naissance. Tout évènement répondant à cette définition doit être déclaré aux autorités.

Il est difficile d'estimer le nombre annuel d'avortement bovins du fait que certains passent inaperçus et d'autres ne sont pas déclarés.

L'avortement chez la vache peut avoir des causes infectieuses (bactéries, virus, parasites) ou non tels que les facteurs nutritionnels, chimiques, physiques, génétiques, endocriniens, immunologiques ou iatrogènes. Le taux des avortements d'origine infectieuse est généralement plus élevé chez les espèces à placentation épithéliochoriale. Des études attribuent à une cause infectieuse 80 à 90% des avortements chez les bovins (Bertrand, 1972).

Les virus les plus fréquemment impliqués sont le virus de la diarrhée bovine virale (BVDV) (Lanyon et Reichel, 2014), l'herpès virus bovin de type 4 (BoHV4) (Chastant-Maillard, 2015), l'herpès virus bovin de type 1 (BoHV1) (Talafta *et al.*, 2012), et plus récemment le virus Schmollenberg (Pawaiya et Gupta, 2013). Les bactéries les plus communément décrites sont *Brucella abortus* (Olsen et Palmer, 2014), *Chlamydia abortus* (Kaltenboeck *et al.*, 2005), *Coxiella burnetii* (Agerholm, 2013), *Leptospira interrogans* sérovar *hardjo* (*L. hardjo*) (Smith *et al.*, 1994), *Salmonella enterica* sérovar *dublin* (*S. dublin*) (Nielsen, 2013), *Campylobacter fetus* subsp. *Veneralis* (Truyers *et al.*, 2014), et *Listeria monocytogenes* (Yildiz *et al.*, 2009). *Neospora caninum* (Almeria et Lopes Gatus, 2013) et *Tritrichomonas fetus* (Felleisen *et al.*, 1998) sont les parasites les plus couramment associés à l'avortement. Parmi les champignons, *Aspergillus* sp. a déjà été impliqué dans les avortements chez la vache (Knudtson et Kirkbride, 1992).

Habituellement, les causes infectieuses peuvent être associées à des avortements sporadiques et épidémiques, souvent sans signes cliniques autres que l'avortement (Clothier et Anderson, 2016).

L'identification des causes de l'avortement est essentielle pour adopter des solutions rationnelles sur la santé des troupeaux qui réduiront les pertes dues aux avortements.

Le diagnostic de la cause de l'avortement passe par l'anamnèse, l'examen clinique et l'observation de lésions. Mais ceci ne conduit souvent qu'à des suspicions de maladie étant à l'origine de l'avortement. Les principales raisons de la difficulté à trouver la cause des avortements sont généralement : le peu de signes cliniques avant l'avortement, l'absence de

lésions pathognomoniques, le manque en tests de confirmation disponibles pour certains pathogènes, le temps écoulé entre l'expulsion et l'examen des tissus fœtaux et l'autolyse des lésions fœtales ou lésions peu visibles (Anderson, 2007).

En outre, il est souvent difficile de déterminer si l'un des agents abortifs est la cause de l'avortement car ils peuvent également être trouvés dans le tractus reproducteur des vaches saines.

Pour pouvoir déterminer avec certitude cette cause, il faut le plus souvent réaliser des examens complémentaires.

Malgré toutes ces démarches mises en place pour diagnostiquer l'origine d'un avortement, 50 % des avortements n'ont pas d'origine identifiée

Des mesures de contrôle efficaces nécessitent non seulement un diagnostic rapide et précis de l'avortement, mais aussi une compréhension des multiples facteurs impliqués dans ce genre d'entrave à la reproduction.

Peu d'informations sur la situation des avortements du bétail en Algérie sont disponibles car les avortements ne sont pas recensés puisque non déclarés.

Le but de cette recherche était de réaliser une approche épidémiologique et prospective du diagnostic des causes infectieuses les plus fréquentes de l'avortement bovin. L'enquête a été menée en comparant les données des vaches ayant avorté et celles n'ayant jamais avorté en analysant soit la présence d'anticorps dirigés contre *Neospora caninum*, BVDV, BoHV1, BoHV4, *Leptospira hardjo*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii* et *Chlamydophila abortus* ou la présence d'ADN de *Salmonella dublin* ou encore mettre en évidence par culture *Tritrichomonas fetus*, *Listeria monocytogène* et *Salmonella sp.*

I. REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE

•
•

Étiologie des avortements bovins : causes non infectieuses et causes infectieuses

I. Causes non infectieuses

1. Traumatismes et bâtiments

Certains avortements ont une origine traumatique dont la cause principale est un mauvais aménagement du bâtiment. Des sols glissants (non rainurés ou rainurage ancien) favorisent les chutes et les surfaces vulnérantes entraînent des blessures. Il faut également prendre en compte le fait que, dans certains élevages, les vaches conservent leurs cornes et peuvent donner des coups à leurs congénères. On observe surtout ce phénomène lorsque la vache est dominée par d'autres et d'autant plus quand la densité animale dans le bâtiment est élevée et quand les couloirs de circulation sont étroits.

Le bâtiment joue un autre rôle dans la survenue d'avortements puisque les germes abortifs excrétés peuvent persister longtemps dans le sol, les litières et sur les murs. L'éleveur a donc un grand intérêt à avoir un box d'infirmerie et de vêlage séparés du reste des vaches. Il faut que ces espaces soient facilement nettoyables et désinfectables.

2. Causes iatrogènes

Le placenta est perméable aux glucocorticoïdes naturels et de synthèse et l'injection de ces molécules peut entraîner un avortement.

La PGF2 α (prostaglandine F2 α) a un effet lutéolytique : elle lyse le corps jaune. Cette molécule est efficace à partir du 5^{ème} jour qui suit la formation du corps jaune et jusqu'à ce que le relais placentaire se mette en place, aux alentours du 200^{ème} jour de gestation (Bricout, 2014). Lors de cette période, l'injection de PGF2 α peut être suivie d'un avortement.

L'utilisation d'antiparasitaires benzimidazoles tel l'albendazole. Cette molécule inhibe la différenciation et la croissance cellulaire. Elle se fixe aux dimères de tubuline et empêche alors l'association des sous-unités dans les microtubules. Elle présente donc une activité antimitotique qui se traduit par des malformations ou des anomalies de développement du fœtus (Enriquez et Beugnet, 1998).

La palpation transrectale est une méthode de diagnostic de gestation réalisable dès 30 jours post-insémination. Si elle est réalisée de façon non précautionneuse, elle pourrait être à l'origine de mortalité embryonnaire (avant le 42^{ème} jour de gestation) mais pas d'un avortement.

3. Intoxications

- Par la consommation de plantes : l'avortement peut être provoqué par la consommation de substances à effet utérotonique présentes dans certaines plantes (ex : la berce commune, *Heracleum sphondylium*). Certaines toxines sont à l'origine d'avortements car elles possèdent une activité analogue à une hormone, telle que les oestrogènes, entrant en jeu dans le maintien ou non de la gestation. (ex : légumineuses, Medicagosativ (Luzerne commune) ou *Trifolium* (Trèfle) qui produisent des phyto-oestrogènes). Elles sont susceptibles de provoquer un avortement de la vache et, ce, dès le premier tiers de gestation (Bricout, 2014).

- Par des phyto-oestrogènes : les phyto-oestrogènes ont une structure chimique ressemblant à celle de l'oestradiol. Le rôle des oestrogènes dans le maintien de la gestation chez la vache n'est pas connu avec précision. L'augmentation de leur concentration en fin de gestation entraînerait la maturation placentaire, la stimulation des contractions du myomètre et l'ouverture du col utérin. La consommation de phyto-oestrogènes mimerait donc l'augmentation de la concentration en oestradiol habituellement observée en fin de gestation et serait à l'origine de la mise-bas (Constant *et al.*, 2006).

Elles sont produites naturellement par certaines légumineuses (soja, luzerne, trèfles dont le trèfle blanc, *Trifolium repens*, qui est le plus commun dans les prairies naturelles) (ensilage, enrubannage, foin, bouchons...) (FEADER, 2010). La consommation d'un fourrage riche en phyto - oestrogènes peut conduire à des troubles de la reproduction. Les signes observés sont des modifications des organes génitaux (gonflement de la vulve, développement mammaire), des troubles ovariens (kystes, anoestrus), de la mortalité embryonnaire et des avortements (FEADER, 2006).

Par des mycotoxines : les bovins sont sensibles à plusieurs mycotoxines synthétisées par divers champignons (Lynch, 1972) tels l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine synthétisées par *Aspergillus*, la zéaralénone synthétisée par *Fusarium*, l'ergotamine, l'ergotoxine et l'ergométrine synthétisées par *Claviceps* et la stachybotryotoxine synthétisée par *Stachybotrys*. Ces mycotoxines sont trouvées dans divers types d'aliments comme les céréales, le seigle, la paille, le fourrage etc...

La contamination des aliments se fait souvent par développement de champignons dans les récoltes suite à de mauvaises conditions de stockage (Lynch, 1972). Il peut cependant arriver que les champignons soient déjà présents lors de la récolte, le stockage n'intervient donc pas dans le développement de ceux-ci.

Par des polluants alimentaires : tels les nitrates qui ont trois origines, les engrais azotés minéraux, les engrais azotés organiques c'est à dire les lisiers et l'humus du sol (il libère de

l'azote au cours de la nitrification) (Meissonier, 1978). Une fois dans le rumen, les nitrates sont réduits en nitrites par la flore du rumen. Ils sont alors rapidement absorbés par la muqueuse du rumen et expriment leur fort pouvoir toxique. L'hémoglobine est convertie en méthémoglobine et entraîne une baisse du transport de l'oxygène.

4. Autres causes abortives non infectieuses

- Mauvais état général de la mère : un mauvais état général de la mère et en particulier une hyperthermie importante et prolongée peut entraîner un avortement.
- Carences en sélénium : la dystrophie musculaire chez le fœtus est associée à une déficience en sélénium. On retrouve certaines lésions chez le fœtus comme une cardiomégalie, de l'ascite et un foie nodulaire (Côté, 2005). Ces avortements dus à une carence de sélénium ne se rencontrent que lors de carences très sévères (Côté, 2005).
- Stress thermique : la zone de thermo-neutralité des vaches en lactation se situe entre - 5°C et + 20°C. En deçà et au-delà de ces températures, des mécanismes de thermorégulation entrent en jeu et la fécondité peut être affectée, il s'agit de la notion de stress thermique. Contrairement aux fortes chaleurs (la température critique maximale tolérable de l'air est de + 25°C), le froid n'aurait que peu d'impacts sur la reproduction (Bonnefoy, 2011).

Les **avortements** liés à un stress thermique trop important sont dus à une réduction de la perfusion utérine. Mais le stress thermique est surtout à l'origine de mortalité embryonnaire en raison d'une baisse du taux de vitamine C (antioxydant). On note également des perturbations dans les sécrétions hormonales (GnRH (*Gonadotropin-releasing hormone*), prolactine et stéroïdes) entraînant des problèmes de fertilité (Bonnefoy, 2011). Raison d'une baisse du taux de vitamine C (antioxydant). On note également des perturbations dans les sécrétions hormonales (GnRH (*Gonadotropin-releasing hormone*), prolactine et stéroïdes) entraînant des problèmes de fertilité (Bonnefoy, 2011).

- Gémellité : l'incidence de la gémellité est de 1,0 % en élevage laitier et de 0,5% en élevage allaitant. Cette incidence varie aussi en fonction de la race et de l'âge des vaches (Noakes *et al.*, 2006).

Le plus souvent, on note la présence d'un corps jaune sur chaque ovaire et un fœtus dans chaque corne utérine (Noakes *et al.* 2006). Les échecs de gestation suite à une double ovulation sont principalement dus à de la mortalité embryonnaire (Lopez-Gatius, 2005).

La capacité utérine est un facteur limitant pour la survie des fœtus. Ainsi une gestation multiple est plus souvent suivie d'avortements. La mise en place d'anastomoses vasculaires entre les

foetus semble aussi intervenir dans leur survie. Lors de la mort de l'un des deux, des substances toxiques peuvent atteindre le second foetus et entraîner sa mort (Echternkamp *et al.* 2007).

- Torsion utérine, gestation extra-utérine : Une torsion utérine dont le degré est supérieur à 180° entraîne un arrêt de vascularisation du placenta et la mort du foetus. La gestation extra-utérine est extrêmement rare chez les bovins et s'accompagne toujours de mort fœtale

II. Causes infectieuses d'avortement

1. Agents bactériens

Brucella abortus

La bactérie la plus concernée par les avortements bovins est *Brucella abortus*. *Brucella melitensis* est plutôt impliquée dans des avortements ovins et caprins (FEADER, 2010). Il existe 9 biovars de *Brucella abortus*. Les bactéries qui ont été isolées en France font principalement partie des biovars 3, 4 et 1 (Ganière, 2010). En Belgique, il s'agit du biovar 1, 6 et 9 de pathogénicité forte à très forte chez l'homme (Alton *et al.*, 1988 ; Papas *et al.*, 2005). En Algérie, des travaux sur la caractérisation de 24 souches de *Brucella* chez le bovin ont montré la présence du biovar 3 et dans une moindre mesure le biovar 1 (Khames *et al.*, 2017).

Il s'agit de petits coccobacilles (environ 1,5 µm) à Gram négatif, immobiles. Elles ne sont pas décolorées par la technique de Ziehl-Neelsen (Lefèvre, 2010).

Le génome des brucelles est composé de deux chromosomes circulaires à l'exception de *Brucella suis* qui n'en possède qu'un. *Brucella abortus* est une bactérie aérobie, capnophile, catalase-positive, oxydase-positive, uréase-positive. Un milieu enrichi en sang ou sérum est nécessaire à la croissance de *Brucella abortus* (Quinn *et al.*, 2010).

Après pénétration dans l'hôte, les brucelles atteignent les nœuds lymphatiques où elles peuvent persister plusieurs années. Si les brucelles ne sont pas éliminées par l'organisme à ce stade, elles peuvent coloniser l'ensemble de l'organisme par le sang. Il en résulte une bactériémie et une propagation dans divers tissus et principalement dans les tissus reproducteurs. La cible privilégiée des brucelles est le placenta. Ces bactéries sont quiescentes et lors d'une baisse de l'immunité, comme pendant la gestation, leur multiplication reprend (Lefèvre, 2010).

Brucella abortus se multiplie dans l'espace utéro-chorial, entraînant une placentite exsudative et nécrotique. Si les lésions provoquées par cette atteinte placentaire sont étendues, le foetus meurt par anoxie et il y a avortement. Mais si les lésions sont limitées, l'infection brucellique

est compatible avec la survie du fœtus. Il est par contre fréquent d'observer une mise-bas prématurée et/ou des lésions cérébrales d'origine hypoxique entraînant la mort du veau dans les 48 heures suivant sa naissance (Ganière, 2010).

Les avortements brucelliques sont de type enzootique. L'infection par *Brucella abortus* entraîne un avortement dans la deuxième moitié de gestation ou la naissance prématurée de veaux faibles. Ils ont principalement lieu lors de la première gestation suivant l'infection et les avortements suivants surviennent de plus en plus tardivement chez la même vache (FEADER, 2010). L'avortement survient de quelques semaines à quelques années après l'infection (Ganière, 2010).

La première année, lors de la survenue de brucellose dans un élevage naïf, on observe un pic d'avortements. Puis, les années suivantes, du fait de la mise-en-place d'une immunité, le nombre d'avortements diminue mais les vaches restent excrétrices de brucelles. Cela rend possible la contamination des génisses ou des vaches nouvellement introduites dans le troupeau (Guerin, 2010).

Une rétention annexielle et une endométrite peuvent être des signes indicateurs de brucellose (Ganière, 2010).

Les lésions placentaires peuvent varier en intensité et ne sont pas pathognomoniques de la brucellose. On peut observer des formes chroniques ou aiguës de placentite, avec des zones dégénératives et nécrotiques dans le trophoblaste chorio-allantoïque, au sommet des cotylédons (Lefevre, 2010). Les cotylédons peuvent apparaître rouges, jaunes, nécrotiques ou être d'apparence normale (Lefèvre, 2010).

A l'examen histo-pathologique, on peut observer au niveau des villosités, une nécrose de l'épithélium et une infiltration par des cellules mononucléées et des neutrophiles (Lefèvre, 2010).

Lésions fœtales : des signes de pneumonie et des épanchements séro-hémorragiques dans les grandes cavités sont observables. Moins fréquemment, une pleurésie fibrineuse, de la vasculite et une méningite sont présentes. (Lefèvre, 2010).

Le rôle de la brucellose dans les avortements était prépondérant. Elle aurait été à l'origine de 40% des avortements (Ganière, 2010).

Coxiella burnetii

Coxiella burnetii est la bactérie à l'origine de la fièvre Q. Cette bactérie est un pathogène intracellulaire strict et il s'agit d'une bactérie Gram négatif, aérobie stricte (Grosjean, 2010).

Coxiella burnetii est une bactérie présentant une variation de phase antigénique, elle peut être en phase I ou en phase II. Les bactéries en phase I ont des colonies lisses (*smooth*). Elles peuvent entrer et survivre dans les macrophages. Il s'agit de la forme infectieuse qui présente le plus grand pouvoir immunogène. Le passage à la phase II est consécutif à des mutations spontanées de bactéries en phase I. Les colonies des bactéries en phase II sont rugueuses (*rough*). Ce nouveau variant antigénique présente une virulence et un pouvoir immunogène moins important. Par contre, les bactéries en phase II pénètrent mieux dans les cellules (Guatteo, 2009).

La pathogénie de la fièvre Q a principalement été étudiée sur les souris. Il a été observé que, suite à l'inhalation des bactéries, celles-ci colonisent des cellules pulmonaires telles que les fibroblastes et les histiocytes. Elles diffusent ensuite par voie sanguine jusqu'au foie, la rate et l'utérus des femelles gestantes (Guatteo, 2009).

Ce sont des bactéries quiescentes et leur multiplication reprend lors d'une baisse de l'immunité comme lors de la gestation (Guatteo, 2009).

Il semblerait que l'avortement soit dû à l'existence d'une placentite entraînant une anoxie et la mort du fœtus.

L'avortement dû à *Coxiella burnetii* survient à tout stade de gestation mais plus fréquemment dans sa deuxième moitié. On peut également avoir la naissance de veaux prématurés et de veaux chétifs. De façon concomitante, des affections de la reproduction sont souvent présentes : métrites et retours en chaleurs tardifs (FEADER, 2010). Les métrites sont souvent résistantes aux traitements mis en place.

Le placenta est œdémateux ou gélatineux. Le mucus présente une couleur violacée ou marron. Dans certains cas, les cotylédons sont nécrotiques et les membranes sont épaissies et solides. Ces aspects ne sont pas spécifiques d'une atteinte par *Coxiella burnetii* (Lefèvre, 2010).

Les lésions fœtales ne sont pas spécifiques d'une atteinte par *C. burnetii* (Lefèvre, 2010). Neikov a montré que des fœtus ovins issus d'avortements par la fièvre Q présentaient des lésions nécrotiques sur le foie, les reins, les glandes surrénales et certains nœuds lymphatiques. Il a également mis en évidence une méningo-encéphalite lymphocytaire (Neikov, 1987).

La fièvre Q est une maladie très répandue au niveau mondial (Toma, 2010). Il s'agit d'une zoonose majeure. La contamination humaine résulte la plupart du temps d'inhalation de poussières contenant *Coxiella burnetii*. Il s'agit d'une bactérie qui est très résistante dans le milieu extérieur (Toma, 2010).

De façon plus anecdotique, la contamination peut se faire par franchissement de la peau à la faveur d'une blessure (Toma, 2010).

Les signes cliniques sont sévères et se présentent sous diverses formes. La forme aiguë peut se caractériser par un syndrome fébrile, une pneumonie ou une hépatite. La forme chronique est quant à elle à l'origine d'avortements ou de naissances d'enfants mort-nés. Enfin, des personnes immunodéprimées ou souffrant d'une valvulopathie peuvent développer une endocardite (Guatteo, 2011).

Une évaluation qualitative de 69 publications sélectionnées a montré une prévalence sérologique apparente de *Coxiella burnetii* de 20,0% à titre individuel et de 37,7% à l'échelle des troupeaux (Guatteo, 2011).

En Algérie, une étude menée sur les petits ruminants a montré une séroprévalence individuelle de 14.1% (95% CI=11.8-16.4%) et 58% (95% CI=40-76%) à l'échelle des troupeaux (Khaled *et al.*, 2016). Une autre recherche effectuée sur des dromadaires a révélé une séroprévalence de *C. burnetii* au niveau animal de 71,2% (IC 95% : 65,2-78,3) et de 85,3% (IC 95%: 72,8-97,8) au niveau du troupeau (Benaissa *et al.*, 2017).

En France, cette bactérie fait partie, avec *Neospora caninum* et le virus de la BVD, des trois principaux agents abortifs des ruminants (GDS, 2013).

La fièvre Q fait partie de la liste 2007 de l'OIE qui regroupe les maladies d'intérêt en matière de santé publique (OIE, 2013).

Salmonella

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et contient plus de 2500 sérovars (FEADER,2010). Ce sont des bactéries bacilles Gram négatif, aérobies et mésophiles de 0,7 µm à 1.5 µm de largeur sur 2.0 µm à 5.0 µm de longueur, ne présentent ni spores ni capsule, mobiles grâce à une ciliature péritriche, à l'exception de certains mutants immobiles (*Salmonella Pullorum Gallinarum*) et *S. Avium* (Fasquelle, 1974 ; Avril et Faucher ,2002 ; Fosse et Magras ,2004).

Elles sont à multiplication intracellulaire facultative (Buret, 2006). Elles ne se multiplient pas dans le milieu extérieur mais sont très résistantes (plusieurs semaines dans le fumier et plusieurs mois dans le lisier ou l'eau) (Buret, 2006).

Les salmonelles se multiplient de 7 à 41°C et sont détruites par des températures de l'ordre de 65/70°C appliqués durant 5 à 15 minutes. Plym-forshell et Ekesbo (1993) ont observé que *S. typhimurium* et *S. dublin* survivaient au moins 35 jours dans le fumier des bovins, mais pas plus de 24 heures dans une cuve à fermentation à 55°C (Fosse et Magras ,2004 ; Silue ,2007).

Les Salmonelles sont inactivées par la lumière et les rayons ionisants et sont relativement sensibles au sel (NaCl), elles ont pu être isolées de saumures à 3,2 % (Peiffer, 1999).

Les salmonelles se multiplient à des pH compris entre 4,5 et 9,0 avec un optimum entre 6,5 et 7,5, mais peuvent supporter des pH plus acides allant jusqu'à 3,8, elles sont détruites à des pH inférieurs à 3,8 et supérieurs à 9,4 (Grimont *et al.*, 2000).

Leur classification est basée sur le système de Kaufmann et White. Celle-ci prend en compte la présence ou non d'antigènes somatiques (O) ou flagellaires (H), occasionnellement capsulaires (Vi). A partir de ce schéma, deux espèces sont proposées : *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*. La plupart des salmonelles impliquées dans les affections des bovins appartiennent à l'espèce *enterica*. Au sein de cette espèce, on distingue plusieurs sous-espèces dont *thyphimurium* et *dublin* sont les plus connues (Quin, 2010).

Le RESSAB (Réseau d'Epidémiologie-Surveillance de la Salmonellose Bovine) travaille sur la forme diarrhéique de la salmonellose bovine. Les résultats de leurs études ont montré que les salmonelles les plus fréquemment mises en évidence étaient *Salmonella thyphimurium* (Chazel *et al.*, 2005).

D'après une étude réalisée en Grande-Bretagne entre 2003 et 2008, les sérotypes les plus souvent impliqués dans les salmonelloses cliniques sont *Salmonella thyphimurium* et *Salmonella dublin*. L'avortement était le principal signe clinique dans 26,7% des cas de salmonellose à *Salmonella dublin*, alors que cela concernait uniquement 2,6% des cas de salmonellose à *Salmonella thyphimurium*. Des avortements ont également été observés lors de l'intervention d'autres sérovars. Ils concernaient 16,7% des manifestations cliniques de *Salmonella montevideo*, 13,3% pour *Salmonella mbandaka*, 10,2% pour *Salmonella newport* et 8,9% pour *Salmonella agona* (+Carrique-Mas *et al.*, 2010).

Les principales voies d'entrée des salmonelles sont la voie orale et la voie pulmonaire. Lors d'une contamination par voie orale, les salmonelles passent la barrière épithéliale au niveau de la muqueuse de l'iléon. Les salmonelles envahissent alors les entérocytes dont les cellules M. Ces cellules M ont pour rôle de capter des particules en position intra-luminale et de permettre l'action des macrophages et lymphocytes. Lorsque les salmonelles sont en position intracellulaire au sein des macrophages, différents mécanismes interviennent et évitent leur destruction. Le premier est l'inhibition de la fusion entre les phagosomes et les lysosomes. Et le deuxième mécanisme fait intervenir une protéine interne de *Salmonella thyphimurium*, la protéine *PhoQ*. Cette protéine permet la phosphorylation de la protéine *PhoP* qui agit à son tour sur la transcription de divers gènes. Ainsi, les gènes *pagC* et *pagD* sont activés et permettent la

synthèse de protéines qui entrent dans la composition de la membrane bactérienne et qui lui confèrent une résistance vis-à-vis de la phagocytose (Schelcher *et al.*, 1997). Cette résistance à la phagocytose rend possible la bactériémie et la dissémination des salmonelles dans l'organisme dont l'utérus.

Suite à la contamination par des salmonelles, plusieurs scénarios sont possibles. Le premier correspond à l'élimination complète des salmonelles par l'organisme et la guérison de l'animal. Dans un second cas, les salmonelles peuvent rester en position intracellulaire au sein des macrophages dans les nœuds lymphatiques mésentériques. Dans ce cas, on dit que l'animal est porteur latent. Enfin, les cellules infectées par la bactérie peuvent passer dans la circulation sanguine et se disséminer dans l'organisme. L'animal présente alors une bactériémie. C'est dans ce dernier cas que la bactérie peut atteindre l'utérus et entraîner un avortement (Martel, 2001).

Il existe deux hypothèses concernant l'avortement ou la naissance prématurée de veaux de mère infectée par des Salmonelles :

- la première propose qu'ils soient directement la conséquence d'une invasion et d'une multiplication des Salmonelles dans le placenta ;
- la seconde hypothèse met en jeu des endotoxines (le lipopolysaccharide ou LPS) présentes sur la membrane externe des bactéries Gram négatif (Lefèvre, 2010) ;

L'avortement dû aux salmonelles se déroule en général entre 124 et 270 jours de gestation, la plupart du temps entre 160 et 180 jours. L'avortement peut survenir suite à une entérite ou sans signe annonciateur (surtout avec *Salmonella dublin*). L'avortement peut survenir plusieurs jours (8-21 jours) après l'infection initiale qui est caractérisée par une forte hyperthermie (Lefèvre, 2010). Lors d'avortements dus aux salmonelles, il est fréquent d'observer une placentite et des lésions nécrotiques au niveau des cotylédons, mais ces lésions ne sont pas spécifiques de cette affection (Lefèvre, 2010).

Le fœtus peut présenter un œdème sous-cutané, de la congestion et une nécrose hépatique et pulmonaire (Caron, 1997).

Une étude réalisée en Californie entre 1998 et 2003 sur 2296 cas d'avortements a montré que 1,6% étaient dus à la salmonellose (Anderson *et al.*, 2007).

La salmonellose est présente partout dans le monde. Les cas surviennent sporadiquement ou de manière groupée. Elle est principalement associée aux sérotypes *dublin* et *typhimurium*.

Les tableaux 1, 2 & 3 reprennent les différentes prévalences de Salmonella rapportées dans la littérature.

Tableau 1:Prévalence de *Salmonella.spp* dans les matières fécales des bovins (Hezil, 2014)

Animal	Pays	La méthode utilisée	Nombre de prélèvements (Matières Fécales)	Prévalence salmonella .spp	Références
Bovin	USA	Culture	/	16%	Pacer <i>et al.</i>, 1989
	(Californie)				
	Espagne	Culture	333	0,9%	Adésiny <i>et al.</i>, 1996
Vache					
Vache	USA	Culture	/	5,4%	Wells <i>et al.</i>, 2001
Vache	USA	Culture	/	6%	Huston <i>et al.</i>, 2002
Vache	USA	Culture	4049	9,3%	Warnick <i>et al.</i>, 2003
Vache	USA	Culture	/	4,8%	Fosseler <i>et al.</i>, 2004
Bovine	USA	Culture	1560	393 (25,19 %)	Edrington <i>et al.</i>, 2004
Vache	USA	Culture	960	93 (9.96 %)	Callaway <i>et al.</i>, 2005
Vache	Angleterre	Culture	/	1,4%	Milnes <i>et al.</i>, 2009
Vache	USA	Culture	5795	588 (10,1%)	Cummings <i>et al.</i>, 2010
Vache	Burkina-Faso	PCR	304	52%	Kagambèga <i>et al.</i>, 2013

Tableau 2 : Prévalence de *Salmonella dublin* dans les matières fécales de vaches (Hezil, 2014)

Animal	Pays	La méthode utilisée	Nombre de prélèvements (Matières Fécales)	Prévalence de <i>salmonella dublin</i>	Références
Bovine	USA (Californie)	Culture	/	10,7%	Pacer <i>et al.</i>, 1989
Vache	Danemark	Culture	4531	6%-14%	Nielsen <i>et al.</i>, 2004
Bovine	USA	Culture	393/1560	1 %	Edrington <i>et al.</i>, 2004
Vache	Danemark	Culture	6331	2003 : 24%	Ersboll et Nielsen , 2011
Vache	Danemark	Culture	6614	2009 : 12% 0,3% - 2,8%	Nielsen <i>et al.</i>, 2013

Tableau 3 : Prévalence *Salmonella dublin* dans le lait (Hezil, 2014).

Animal	Pays	La méthode utilisée	Nombre de prélèvements (Lait)	Prévalence <i>salmonella dublin</i>	Références
Vache	USA (Californie)	ELISA	/	14,1%	Smith <i>et al.</i>, 1989
vache	USA	Culture	861	0,11% (n=1)	Van Kessel, 2004
Vache	Danemark	ELISA	/	11%	Nielsen, 2009
Vache	Californie	Culture	/	13%	Poppe, 2011
Vache	Suède	ELISA	1069	17%	Nynan <i>et al.</i>, 2013
Vache	Irlande	ELISA	309	49%	Doherty <i>et al.</i>, 2013 ;2014

Chlamydomophila

Le genre *Chlamydomophila* appartient à la famille des *Chlamydiaceae*. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif.

La bactérie *Chlamydomophila abortus* est l'espèce la plus souvent impliquée dans les avortements bovins (Quinn, 2010). Elle est à l'origine du syndrome d'avortement épizootique bovin (Degraives *et al.*, 2004). C'est un pathogène intracellulaire obligatoire incapable de synthétiser de l'ATP par lui-même et se réplique uniquement dans des cellules vivantes (Quinn, 2010).

Dans le cycle de développement des *Chlamydomophila*, les formes infectieuses et reproductives sont morphologiquement distinctes. Les formes infectieuses extracellulaires sont appelées corps élémentaires. Elles sont de petite taille (de 200 à 300 nm) et sont métaboliquement inertes. Chaque corps élémentaire est entouré par une membrane cytoplasmique, un espace périplasmique et une enveloppe externe contenant des lipopolysaccharides. Ces corps élémentaires pénètrent dans les cellules cibles par endocytose médiée par des récepteurs cellulaires. La pénétration du corps élémentaire dans la cellule entraîne sa conversion en un corps réticulaire. Cet élément est métaboliquement actif et peut se répliquer. En règle générale, la réplication se poursuit jusqu'à 72 heures après l'infection (Quinn, 2010).

Après contamination par voie orale, les *Chlamydomophila* se multiplient au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse gastro-intestinale, ce qui entraîne l'apparition de troubles digestifs. Puis, suite à l'invasion de la *lamina propria* de l'intestin grêle, les bactéries parviennent jusqu'à la circulation sanguine et lymphatique, ce qui est à l'origine d'une bactériémie primaire. Cet état de bactériémie permet la colonisation de différents organes dont l'utérus. L'infection par des *Chlamydomophila* peut donc entraîner un avortement chez une femelle gravide (Fred *et al.*, 1984).

L'avortement peut être dû à une atteinte directe du fœtus par perte de la zone pellucide ou par inflammation de l'utérus le rendant non viable à la survie du fœtus (Degraives *et al.*, 2004).

L'infection par des *Chlamydia* est le plus souvent bien tolérée par l'organisme et un état d'équilibre s'installe entre le pathogène et l'hôte. L'animal est alors infecté chronique sans qu'aucun signe clinique ne se développe (Degraives *et al.*, 2004).

Les vaches au deuxième trimestre de gestation sont les plus sensibles aux *Chlamydomophila*. L'avortement survient généralement de 45 à 120 jours après l'infection, donc aux alentours du 6ème et 8ème mois de gestation (Fred *et al.*, 1984). Cela concerne principalement les génisses lors de leur première gestation (Borel *et al.*, 2006). En général, les vaches infectées lors du troisième trimestre de gestation n'avortent pas même si la bactérie est présente au niveau du placenta. Il arrive que certaines vaches mettent bas prématurément (Fred *et al.*, 1984).

D'autres signes cliniques peuvent être observés chez la vache : endométrite, *repeat-breeding* et vaginite (Godin *et al.*, 2008). La chlamyphilose est, en effet, à l'origine d'infertilité sub-clinique (Kaltenboeck, 2005).

Borel et ses collaborateurs ont réalisé une étude qui a permis de décrire les principales lésions placentaires observées lors d'avortements à *Chlamydomphila* (Borel *et al.*, 2006). Cette étude porte sur 235 avortements pour lesquels la fièvre Q, la brucellose et l'IBR ont été écartés. En revanche, les analyses PCR et immuno-histochimiques ont donné des résultats positifs pour diverses espèces de *Chlamydomphila*. La première analyse PCR a montré que 55 échantillons étaient positifs à une espèce de *Chlamydomphila* : 6 positifs pour *Chlamydomphila abortus*, 6 positifs pour *Chlamydomphila psittaci* et 43 positifs pour un organisme apparenté à des *Chlamydomphila* (dont 9 ont été attribués à *Parachlamydia acanthamoebae*). Le second type d'analyse PCR (utilisant une autre amorce que la première) a permis de montrer que 10 échantillons sur les 235 étaient positifs à une *Chlamydomphila* : 9 positifs pour *C. abortus* et 1 positif pour *C. psittaci* (Borel *et al.*, 2006).

À l'examen de tous les placentas de l'étude (comprenant également les placentas issus d'avortements qui ne sont pas dus à des *Chlamydomphila*), la lésion la plus souvent observée est une placentite (149 cas sur 235). La plupart des placentas sont purulents et nécrotiques (104 placentas sur les 149 examinés), seuls 37 sont uniquement nécrotiques et 8 uniquement purulents (Borel *et al.*, 2006).

Une vasculite est observée dans 26 cas sur 235. La plupart du temps, les artérioles situées dans la zone inter-cotylédonaire sont infiltrées de polynucléaires neutrophiles (Borel *et al.*, 2006).

L'examen des tissus placentaires a été impossible dans 44 cas sur 235 en raison d'une autolyse trop avancée (Borel *et al.*, 2006).

Le fœtus peut présenter de l'ascite et de l'œdème sous-cutané. Des pétéchies sont aussi observables au niveau de la bouche, de la langue, du thymus et des nœuds lymphatiques. Des nodules hépatiques, des lésions rénales telles que des hémorragies sous capsulaires, une augmentation de taille de la rate et une congestion des vaisseaux sanguins cérébraux peuvent également être présents. À l'examen histo-pathologique, on peut observer des images de nécrose ou d'inflammation hépatique (Fred *et al.*, 1984).

D'après Anderson, les avortements épizootiques bovins dus à *Chlamydomphila abortus* concerneraient jusqu'à 6,5% des cas d'avortements (Anderson *et al.*, 2007).

Une étude a été réalisée au Portugal entre 2005 et 2009, 168 prélèvements d'avortements ont été faits sur des vaches, brebis et chèvres. Une PCR a été mise en œuvre pour permettre la mise en évidence de diverses espèces de *Chlamydomphila* : *Chlamydomphila abortus*, *C. psittaci* et *C.*

pecorum (Tavares *et al.*, 2011). *C. abortus* a été identifiée dans 69 prélèvements (soit 87,3% des cas), *C. psittaci* dans 6 échantillons (soit 7,6% des cas) et *C. pecorum* dans 4 échantillons (soit 5,1% des cas) (Tavares *et al.*, 2011).

Il n'est pas étonnant d'obtenir de tels pourcentages concernant *C. abortus* puisque cette bactérie joue un grand rôle dans les avortements, principalement chez les petits ruminants. *C. psittaci* est rarement associée à des troubles de la reproduction. C'est une bactérie qui est physiologiquement présente dans le tube digestif et les échantillons testés positifs pour cette espèce ont probablement été contaminés lors du prélèvement. Enfin, *C. pecorum* n'a été détectée que dans des échantillons provenant de petits ruminants (Tavares *et al.*, 2011).

Une étude a été réalisée par Godin en Suède entre 2000 et 2006 afin d'évaluer la séroprévalence de différentes espèces de *Chlamydophila* dans les troupeaux bovins laitiers et son lien avec l'existence de problèmes reproducteurs. Les résultats sont concordants avec le fait que *Chlamydophila abortus* est très peu présente en Suède et est rarement associée à des problèmes reproducteurs chez la vache (Godin *et al.*, 2008).

Une étude réalisée à Costa Rica sur un total de 359 ovins issus de 15 élevages différents, a montré la présence d'anticorps dirigés contre *Chlamydophila abortus* chez 19 (5.29%) ovins dans 12 (80%) élevages en utilisant le test sérologique ELISA (Villagra-Blanco *et al.*, 2015).

En Jordanie, une étude transversale a été réalisée pour déterminer la séroprévalence et identifier les facteurs de risque associés à l'infection par *Chlamydophila abortus* dans 62 troupeaux bovins laitiers non vaccinés (671 vaches). Les anticorps contre *C. abortus* ont été détectés en utilisant un kit ELISA. La prévalence réelle des anticorps dirigés contre *C. abortus* chez les vaches et les troupeaux bovins était respectivement de 19,9% et de 66,3% (Talafha *et al.*, 2012).

En Jordanie, une autre étude a été réalisée sur 66 tissus placentaires et 25 écouvillons vaginaux en utilisant cette fois-ci la méthode PCR-RFLP. Le gène OMP2 (codant pour une protéine externe membranaire) a été utilisé pour diagnostiquer les causes d'avortement chlamydiales chez les petits ruminants. Trente-huit échantillons placentaires (58%) et 13 écouvillons vaginaux (87%) étaient positifs pour l'ADN chlamydial (Ababneh *et al.*, 2014).

Ainsi, l'ensemble des résultats concernant *Chlamydophila abortus* montrent que cette bactérie n'est pas fréquemment impliquée dans les avortements bovins. Elle reste cependant présente dans de nombreux élevages mais la plupart du temps, sans qu'aucun signe clinique ne se développe.

Leptospira

Le genre *Leptospira* appartient à la famille des *Leptospiraceae* qui fait partie de l'ordre des *Spirochaetales* (Quinn *et al.*, 2011). Les sérovars de *Leptospira interrogans* les plus fréquemment impliqués dans les avortements bovins sont *Leptospira hardjo* et *L. pomona*. *Leptospira interrogans* sérovars *ictero haemorrhagiae* et *grippo typhosa* sont plus rarement concernés (Anderson *et al.*, 2007).

Pour observer les Leptospires, il est indispensable de disposer d'un microscope à fond noir ou à contraste de phase, ils sont les plus petits spirochètes connus, ce sont en effet des bactéries hélicoïdales, extrêmement fines et flexibles (Ellis *et al.*, 1981), leur taille varie de 6 à 25 µm de long et ont un diamètre de 0,20 µm (Bharti *et al.*, 2003), la forme est spiralée, constituée de vingt à trente hélices très serrés, dont l'amplitude est d'environ 0,1 à 0,15 µm et le pas (longueur d'onde) est d'environ 0,5 µm. (Faine et Stallman, 1982 ; Levett, 2001).

Ce sont des bactéries aérobies strictes, Gram négatif qui sont mobiles grâce à la présence d'un endoflagelle. Elles sont relativement fragiles dans l'environnement et sensibles à la dessiccation (Quinn *et al.*, 2011). Ils sont principalement rencontrés dans les environnements aquatiques, surtout *L. interrogans* (Quinn, 2011).

Le pouvoir pathogène des différents sérovars n'est pas homogène. Cependant, la pénétration d'une quantité suffisante de Leptospires pathogènes dans l'organisme de l'hôte est une condition pour que l'infection se développe. Si ceux-ci sont en quantité insuffisante, il n'y aura pas d'infection possible (Andre-Fontaine *et al.*, 2004).

Plusieurs éléments interviennent dans l'adhésion. En effet, un certain type d'adhésine, les endostatines, qui font partie des OMPs (les protéines de la membrane externe), ont un rôle dans l'interaction avec la fibronectine et la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte d'une part, et dans la liaison avec le facteur H du complément d'autre part.

Les facteurs de virulence des leptospires résident essentiellement dans le lipopolysaccharide (LPS) et dans les protéines de la membrane externe (OMPs). En effet, le LPS présente une activité endotoxinique controversée. Donc, il stimule la phagocytose et la production de cytokine TNF alpha (*Tumor Necrosis factor*) par les monocytes humains, ainsi, il est responsable de formation des agglutinations à l'origine d'une thrombocytopénie, par son stimulation et l'adhésion des polynucléaires neutrophiles aux cellules endothéliales et aux plaquettes (Levett, 2001). Le LPS entraîne la libération de médiateurs pro-inflammatoires et de cytokines par sa fixation sur les récepteurs CD 14 de la surface des macrophages et monocytes. D'autre part, le LPS induit l'apoptose de lymphocytes de la rate. Après avoir réalisé une activation non spécifique des cellules B (Isogai *et al.*, 1998).

L'attachement des leptospires à la membrane extracellulaire de l'hôte est un caractère important pour une souche pathogène. En effet, plus une souche est virulente, plus son adhésion à cette membrane est importante et l'inverse est valable (Toroshihiro et Ryo, 1987).

Après pénétration par les muqueuses ou la peau lésée, une bactériémie se met en place. Les leptospires peuvent alors atteindre différents tissus et entraînent, dans un premier temps, des lésions de l'épithélium vasculaire menant à un phénomène d'ischémie. On peut alors observer une nécrose des tubules rénaux, une nécrose hépato-cellulaire et pulmonaire, une méningite, une myosite et une placentite (Gyles, 2010). Certains sérovars présentent un effet hémolytique (ex : *Leptospira ictero-haemorrhagiae*) (Lefèvre, 2010).

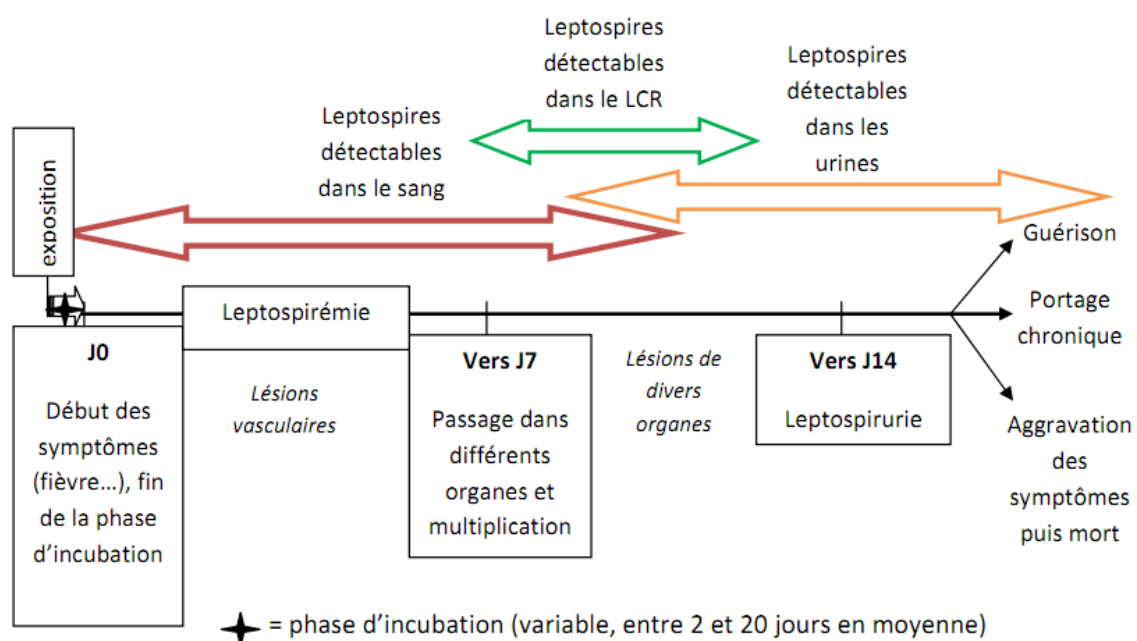


Figure 1 : Déroulement d'une infection leptospirosique de manière schématique (Levett, 2001 ; Boibieux, 2012).

L'apparition des anticorps dirigés contre les leptospires permet leur élimination de la circulation sanguine et des tissus (Gyles, 2010).

La leptospirose chronique entraîne souvent, comme unique signe clinique, un avortement chez la vache (Anderson *et al.*, 2010).

L'infection à *Leptospira hardjo* se traduit par des avortements survenant de 1 à 3 mois après l'infection et à 4 mois de gestation jusqu'au terme. Elle peut également entraîner de l'infertilité et la naissance de veaux faibles (Anderson *et al.*, 2010).

L'infection à *Leptospira pomona* se traduit quant à elle par des avortements survenant de 1 à 6 semaines après l'infection, et souvent lors du dernier trimestre de gestation (Anderson *et al.*, 2010).

Lors d'avortements en série dus à la leptospirose, on peut observer des taux d'avortement allant jusqu'à 10% pour *Leptospira hardjo*, et lors de l'intervention de *Leptospira pomona*, on peut même dépasser ce pourcentage (Anderson *et al.*, 2010).

Les lésions placentaires retrouvées lors de leptospiroses ne sont pas spécifiques de cette affection. On retrouve principalement une placentite (Gyles *et al.*, 2010).

L'avorton est fréquemment lysé et lors d'avortements proche du terme dus à *Leptospira pomona*, le fœtus peut être ictérique. Dans certains cas, on peut observer une nécrose tubulaire rénale, une néphrite interstitielle, une rétention de bile au sein des canalicules biliaires et une méningite non suppurative (Anderson *et al.*, 2010).

D'après l'OIE, la leptospirose est une maladie infectieuse et zoonotique à répartition mondiale. Elle existe sur tous les continents, répandue largement dans la nature, touchant à la fois les pays industrialisés et ceux en voie de développement (Bharti *et al.*, 2003), elle peut infecter de très nombreuses espèces de mammifères. Les cas sont généralement sporadiques ou anazootiques (Laidebeure, 2004). Cependant, l'incidence de la leptospirose est plus élevée dans les régions tropicales ou chaudes (propice à la survie des leptospires dans le milieu) qu'en zones tempérées. Le manque de données sur le continent africain ne permettant pas de conclure sur la prévalence dans cette région du globe. En effet, il est intéressant de préciser que la localisation géographique est souvent associée à un type précis de leptospires.

L'Algérie comme tous les pays du monde a connu plusieurs cas de leptospirose. En effet, une étude a été faite dans la wilaya de Tizi-ouzou entre 2005 et 2008 par Afiri et collaborateurs, ils ont trouvé 88 cas de leptospirose humaine dont 7,95 % dus au séro groupe se jroe. Tous les patients sont des éleveurs de bovins. Le taux de létalité dans cette épidémie est de 2,27 %. Une autre épidémie a été déclarée dans la wilaya de Sétif en 2010 où 27 personnes ont été infectées après avoir consommé de l'eau des puits contaminés le passage de rats, 3 personnes sont décédées et le reste a été hospitalisé et guéri (<http://www.forum-algerie.com/actualite-algerienne>). Dans le monde les derniers rapports indiquent que le taux d'incidence est approximativement de 0,1 à 1/100 000 cas par an pour les climats tempérés et de 10 à 100/100 000, soit une incidence 100 fois plus élevée, en régions tropicales. Lors d'épidémie ou chez les personnes hautement exposées, l'incidence s'élève même à 100/100 000 (Terpstra, 2004). Par exemple l'incidence annuelle peut atteindre 467.8 cas pour un million d'individus à Loei en Thaïlande (Pappas *et al.*, 2008).

En ce qui concerne la leptospirose bovine, aucune donnée n'a été publiée à ce jour pour l'Algérie, à l'inverse de plusieurs travaux qui ont été réalisés dans le monde sur la leptospirose bovine.

Une étude de la prévalence sérologique de *Leptospira hardjo* chez les vaches adultes a été réalisée durant la campagne habituelle de prophylaxie en 2004 en France (André-Fontaine *et al.*, 2010). Un total de 12 343 vaches âgées de plus de 2 ans (réparties en 411 troupeaux) ont donc été prélevées, dont 10 298 vaches allaitantes = 83,4% (réparties en 344 cheptels), 1 762 vaches laitières = 14,2% (réparties en 56 cheptels) et 283 vaches provenant de 11 cheptels mixtes = 2,3%. 40 départements français ont été concernés et les 12 343 sérums ont été analysés grâce à la méthode de micro-agglutination dans des cultures de deux espèces de *Leptospira hardjo* : *Leptospira interrogans* sérovar *hardjo* et *Leptospira borgpeter senii* sérovar *hardjo*. Selon les résultats prenant en compte le titre en anticorps et l'espèce de leptospires, les cheptels ont été classés en différents statuts : cheptel négatif, cheptel ayant eu un contact ancien ou étant en tout début de réponse à la présence de leptospires, cheptel ayant eu une infection récente ou en cours et enfin les cheptels pour lesquels les réponses au test ne permettaient pas de conclure. 41% des cheptels testés ont présenté des profils sérologiques en faveur d'une infection par *Leptospira hardjo*. Pour 37% d'entre eux, l'infection a été considérée comme récente ou active et pour les 4% restants, elle a été considérée comme ancienne ou débutante. Ces résultats montrent la grande diffusion de l'exposition à *Leptospira hardjo* dans les cheptels concernés par l'enquête en 2004. Il est d'ailleurs probable que cette situation perdure et que la leptospirose soit de plus en plus présente dans les cheptels français.

Au Nigeria, en 2012, des travaux sur la séroprévalence de la leptospirose bovine ont montré que sur 164 sérums testés, 10,98% se sont révélés positifs pour le serovar *hardjo* (Ngbede *et al.*, 2012). Une autre étude menée en 2013 dans le même pays mais dans une autre région, a montré que sur 237 animaux prélevés et analysés, 20 (8,44%) se sont montrés séropositifs pour le serovars *hardjo* (Ngbede *et al.*, 2013). En Turquie, une étude réalisée dans la région de Marmara pour déterminer la séroprévalence de leptospirose chez les bovins, a montré que sur 922 sérums examinés par le MAT (Micro Agglutination Test), 31 bovins (3,4%) avaient des titres en anticorps antileptospirosiques supérieurs ou égaux à 100 envers un ou plusieurs antigènes. La séroprévalence selon les serovars individuels était : *hardjo* (2,8%), *grippotyphosa* (0,4%) et *pomona* (0,2%) (Kocabiyik et Cetin, 2004).

Au Québec, le nombre de cas de leptospirose bovine diagnostiqués dans les laboratoires du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) est en recrudescence.

Il est passé de 22 animaux positifs dans 8 fermes en 2005, à 48 animaux positifs dans 24 fermes différentes en 2006, soit deux fois plus d'animaux et trois fois plus de fermes.

Au Brésil, une étude menée sur la séroprévalence bovine a révélé 46,9% de positifs pour le serovar *L. hardjo* sur 379 échantillons de sérum de bovins testés (Lilenbaum et Souza, 2003).

Listeria

La plupart des espèces de *Listeria* sont des coques Gram-positif de petite taille (jusqu'à 2 µm de long). Ces bactéries sont mobiles. Elles présentent les caractéristiques biologiques suivantes : catalase-positif, oxydase-négatif et anaérobies facultatives (Quin, 2010).

Leur culture est possible entre 4 et 45°C et pour un pH compris entre 5,5 et 9,6 sur un milieu non enrichi (Quin, 2010).

Ce sont des micro-organismes intracellulaires facultatifs (Milleman *et al.*, 2000).

Le genre *Listeria* comprend 7 espèces et 16 sérovars. Seules deux espèces ont une importance clinique chez les ruminants : *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* (Milleman *et al.*, 2000).

L. monocytogenes est l'espèce la plus souvent impliquée dans les avortements bovins ; *L. ivanovii* est moins fréquemment mise en cause (Lefèvre, 2010), mais son implication ne doit pas être écartée. Alexander a observé l'implication de *L. ivanovii* dans 4 avortements (Alexander *et al.*, 1992). Il a analysé un total de 243 fœtus ou tissus fœtaux entre 1988 et 1990. Des *Listeria* ont été mises en cause dans 5 avortements : 1 cas concernait *L. monocytogenes*, et les 4 restants concernaient *L. ivanovii*. En Australie, Gill a mis en évidence l'implication de *L. ivanovii* dans 8 avortements (Gill *et al.*, 1997).

Suite à la contamination orale, les bactéries peuvent envahir les phagocytes. En se multipliant au niveau du système réticulo-endothélial, elles entraînent l'apparition de foyers de nécrose sur la rate et le foie. Si l'organisme ne parvient pas à éliminer les bactéries, celles-ci parviennent jusqu'à la circulation sanguine et il y a bactériémie. Les bactéries peuvent alors atteindre de nombreux organes dont l'utérus. Chez la vache gestante, la colonisation du placenta et du fœtus survient dans les 24 heures suivant la bactériémie. L'atteinte placentaire secondaire (œdème, nécrose) entraîne un avortement. Celui-ci survient généralement entre 5 à 10 jours après l'infection (Milleman *et al.*, 2000).

Les avortements surviennent surtout en fin de gestation et de manière sporadique (Milleman *et al.*, 2000). La plupart du temps, ils ne sont précédés d'aucun signe annonciateur (Alexander *et al.*, 1992). Les avortements peuvent être isolés ou en série et surviennent dans les 3 à 4 semaines

suivant la consommation de l'aliment contaminé. Si la contamination a lieu proche du terme, il arrive que le veau survive (FEADER, 2010).

Les facteurs prédisposants sont la gestation, l'existence d'une maladie concomitante et un stress nutritionnel ou environnemental (Alexander *et al.*, 1992).

Il est rare d'observer des rétentions annexielles associées à l'avortement (Lefevre, 2010).

Le placenta présente un certain nombre de lésions : des zones de nécrose jaunâtres en pointes d'épingles sont localisées sur les villosités des cotylédons. On observe également une placentite inter-cotylédonaire couverte par un exsudat rouge/brun (Lefèvre, 2010).

Le fœtus est souvent en autolyse précoce, avec de nombreux foyers de nécrose, principalement visibles sur le foie et la rate. Les liquides présents dans les grandes cavités sont souvent séro-hémorragiques (Lefèvre, 2010).

Une étude réalisée en Californie entre 1998 et 2003 a montré que la listériose était impliquée dans moins d'1% des 2296 avortements étudiés (Anderson *et al.*, 2007).

Campylobacter

Campylobacter est une bactérie à Gram négatif mobile. Elle présente les caractéristiques biologiques suivantes : elle est micro-aérophile, oxydase positive et catalase positive ou négative. La plupart de ces espèces poussent sur le milieu de Mac Conkey (Quinn *et al.*, 2011). *Campylobacter fetus subsp venerealis*, *Campylobacter fetus subsp fetus* et *Campylobacter jejuni* sont les bactéries les plus souvent isolées lors de campylobactériose clinique chez les bovins (Mshelia *et al.*, 2010). *Campylobacter fetus subsp fetus* est celle qui est la plus souvent impliquée dans les avortements bovins. *Campylobacter fetus subsp venerealis* est davantage impliquée dans de l'infertilité et des mortalités embryonnaires (Quinn *et al.*, 2011).

Campylobacter fetus subsp fetus et *Campylobacter fetus subsp venerealis* ont une capsule qui leur confère une résistance particulière à la phagocytose et leur permet de survivre dans le tractus génital (Quinn *et al.*, 2011).

Les taureaux peuvent être porteurs asymptomatiques et contaminer les vaches lors de la saillie. En effet, les *Campylobacter* ont la capacité de survivre au niveau du prépuce, et dans ce cas, le taureau est infecté permanent. Il ne développe aucun signe clinique lié à la présence de cette bactérie (Quinn *et al.*, 2011).

Campylobacter fetus subsp venerealis persiste dans le vagin des vaches porteuses grâce à sa capsule. Elle peut atteindre l'utérus et provoquer une endométrite et une salpingite après la période d'œstrus. Suite à l'infection de l'utérus, la vache peut rester infertile pour une période

de 3 à 5 mois. Après cet épisode, la présence et l'action d'IgA (immunoglobulines A) permet de limiter l'extension des *Campylobacter* (Quinn *et al.*, 2011).

La campylobactériose est une maladie à l'origine d'infertilité temporaire chez la vache associée à la survenue de mortalités embryonnaires et de retours en chaleur irréguliers (Quinn *et al.*, 2011).

Elle est occasionnellement à l'origine d'avortements (Quinn *et al.*, 2011). Ceux-ci surviennent généralement entre 4 et 7 mois de gestation (Anderson *et al.*, 2007).

On peut observer une placentite inter-cotylédonaire associée à de la nécrose et de la coloration jaunâtre des cotylédons (Anderson *et al.*, 2007).

Une étude a été réalisée par Morrell sur 8 fœtus pour lesquels un diagnostic d'atteinte (par immunohistochimie ou culture) par *Campylobacter* a été porté. Une étude histo-pathologique a été réalisée. Un certain nombre de lésions a été mis en évidence sur plusieurs fœtus : une bronchopneumonie neutrophilique et une pneumonie interstitielle (7cas), une entérite interstitielle suppurative (5 cas) et une hépatite multifocale non suppurative (4 cas). Enfin, des lésions ont été observées de façon moins fréquente : une péricardite et une méningite fibrino-suppuratives, une myosite et une myocardite (Morrell *et al.*, 2011).

Les mêmes lésions ont été observées par Campero en 2005 (Campero *et al.*, 2005).

La campylobactériose bovine présente une distribution mondiale. Elle est particulièrement présente dans les pays en voie de développement pour lesquels l'utilisation de l'insémination artificielle est rare (Morrell *et al.*, 2011).

2. Agents viraux

Le virus du BVD

Le virus de la BVD appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Pestivirus* (Murphy *et al.*, 1999).

C'est un virus enveloppé sphérique de 50 nm de diamètre. Le génome est une molécule d'ARN monocaténaire positif. On distingue deux biotypes de virus : la souche cytopathogène et la souche non cytopathogène (Murphy *et al.*, 1999).

Il existe deux types d'antigènes viraux : les glycoprotéines d'enveloppe et les protéines non structurales.

La glycoprotéine d'enveloppe la plus importante est la protéine E2 (correspondant à la glycoprotéine gp53) puisqu'elle entraîne la synthèse d'anticorps neutralisants. Les anticorps se mettent en place dès que le virus est présent, même s'il ne se multiplie pas. Il existe une

deuxième glycoprotéine d'intérêt qui est la protéine E0 (correspondant à la glycoprotéine gp48). Elle entraîne également la formation d'anticorps neutralisants mais elle est moins immunogène (Goyal *et al.*, 2005).

Les protéines non structurales présentant le plus d'intérêt sont la protéine NS2-3 et la protéine NS3 qui est issue du clivage de cette dernière. Elles entraînent la synthèse d'anticorps dès lors que le virus se multiplie. Elles représentent donc des témoins de la multiplication virale. Mais les anticorps produits ne sont pas protecteurs (Goyal *et al.*, 2005).

Ce virus n'est pas très stable dans l'environnement et est facilement inactivé par la chaleur et les désinfectants classiques (Murphy *et al.*, 1999).

La souche non cytopathogène (NCP) du virus de la BVD se multiplie beaucoup et est excrétée de façon massive par l'hôte. Elle est la seule à pouvoir passer par voie transplacentaire et à pouvoir entraîner la formation d'IPI (infectés permanents immunotolérants). Il s'agit de la souche la plus souvent rencontrée (Goyal *et al.*, 2005).

La souche cytopathogène (CP) présente, quant à elle, une capacité de multiplication plus faible et elle ne peut pas passer par voie transplacentaire. Seule la souche CP est à l'origine de la forme MD (maladie des muqueuses) causée par le virus de la BVD (Goyal *et al.*, 2005).

Des mutations intervenant sur la souche non cytopathogène seraient à l'origine de l'apparition de souches cytopathogènes.

Le virus de la BVD est de distribution mondiale (OIE, 2013). Une étude portant sur 2296 cas d'avortements bovins en Californie a montré que 4% d'entre eux étaient dus à la BVD (Anderson, 2007).

Le virus de la BVD est un agent abortif majeur en France car, avec le virus de l'IBR et *Neospora caninum*, il fait partie des 3 agents infectieux les plus souvent mis en évidence lors d'avortements (GDS, 2013).

Le virus de la BVD présente un tropisme particulier pour les cellules épithéliales, les cellules mononucléées du sang (lymphocytes et monocytes) et les cellules en multiplication. Cela explique l'ensemble des signes cliniques observés : malformations fœtales, diarrhée et catarrhe. Le virus se réplique dans un premier temps au niveau de la muqueuse nasale et des tonsilles pharyngiennes. Les antigènes viraux sont surtout présents dans les follicules lymphoïdes et le cortex thymique au sein des cellules du stroma. Ils sont également présents au niveau des tissus lymphoïdes de la muqueuse intestinale (plaques de Peyer). Mais les lésions tissulaires liées à la BVD ne sont pas forcément liées à la présence d'antigènes viraux sur ces sites (Goyal *et al.*, 2005).

Lors d'infections par une souche peu virulente de BVD, le pic de virémie a lieu 6 jours après l'infection initiale puis les virus ne sont plus détectables au niveau des tissus. Dans le cas d'une infection par une souche de haute virulence, la quantité d'antigènes viraux reste très importante et contrairement aux souches de faible virulence, le virus continue à se disséminer dans l'organisme (Goyal *et al.*, 2005).

Si la vache n'est pas gestante, elle présente, suite à l'infection, une phase de virémie puis les virus sont éliminés et la vache est immunisée contre ce virus. Elle peut par contre présenter des troubles de la reproduction tels qu'une ovarite entraînant un anoestrus.

Les troubles reproducteurs rencontrés par ces vaches présentent une pathogénie bien particulière.

Des souches cytopathogènes du virus de la BVD ont été trouvées dans le tissu ovarien de vaches vaccinées contre la BVD. Cela suggère une possible multiplication de ces souches au niveau des ovaires pouvant être à l'origine d'infertilité lors d'infection par le virus (Grooms *et al.*, 1998).

Une autre expérimentation a été menée par Grooms (Grooms *et al.*, 1998). Il a tenté de déterminer les types cellulaires contenant les particules virales au sein des tissus ovariens. 12 génisses infectées par une souche non cytopathogène du virus de la BVD ont été ovariectomisées entre 4 et 60 jours après l'infection. Le virus de la BVD a été isolé le 6ème et 8ème jour après l'infection. Ils étaient contenus au sein de cellules macrophagiques et de cellules du stroma du cortex ovarien. Une ovarite a été mise en évidence entre 6 à 60 jours après l'infection. Ces résultats sont une nouvelle fois en accord avec le fait que le virus de la BVD peut entraîner une ovarite par atteinte de cellules ovariennes. Ceci est à l'origine de la diminution des performances de reproduction, principalement d'une diminution du taux de conception.

Archbald a quant à lui observé la présence d'une souche cytopathogène du virus de la BVD au niveau de l'oviducte à l'origine de salpingite 21 jours après l'inoculation intra-utérine du virus (Archbald *et al.*, 1973). Des études similaires ont mis en évidence la présence de souches non cytopathogènes au niveau de l'oviducte (Grooms *et al.*, 2004).

Avant 40 jours de gestation, il est fréquent d'observer de la mortalité embryonnaire. La vache revient en chaleur. Cela entraîne une baisse des performances de reproduction de l'élevage.

Concernant l'atteinte de la zone pellucide, les études se contredisent. Gillespie a observé que des particules virales peuvent se fixer sur la zone pellucide *in vitro* (Gillespie *et al.*, 1990). Mais d'autres études *in vitro* ont quant à elles mis en évidence que la zone pellucide jouait un rôle protecteur vis-à-vis de ces virus (Potter *et al.*, 1984).

Fredriksen a tenté de déterminer la répartition tissulaire et cellulaire du virus (114). L'utérus, les placentomes, les espaces inter-cotylédonaires et les organes fœtaux de 3 génisses gestantes IPI ont été analysés à l'aide de méthodes immuno-histochimiques. L'utérus et les ovaires de 3 génisses non gestantes IPI ont également été soumis à l'analyse. Les antigènes du virus de la BVD ont été mis en évidence dans tous les organes analysés, à la fois au sein de cellules épithéliales et non épithéliales. La gestation semble favoriser la réplication du virus puisque les coupes d'utérus de génisses gestantes réagissaient plus que celles des génisses non gestantes. Ainsi l'ensemble de l'appareil reproducteur femelle (ovaires, oviductes, utérus) peut contenir des particules virales de BVD. Des études ont observé que l'on pouvait y trouver des souches cytopathogènes et non cytopathogènes (Fredriksen *et al.*, 1999).

Le veau acquiert son immunocompétence entre le 125ème et le 150ème jour de gestation. Si la vache est infectée par une souche non cytopathogène (qui peut donc passer la barrière placentaire) entre le 18ème et le 125ème jour de gestation, le veau est également infecté. Mais puisqu'il est incapable de se défendre contre le virus, il le considère comme un élément du soi et il reste infecté permanent immunotolérant (IPI) (Grooms *et al.*, 2004). Le virus se multiplie de façon importante dans son organisme et dès sa naissance, il en excrète en grande quantité. En buvant le colostrum de sa mère, il acquiert les anticorps dirigés contre le virus de la BVD mais ils ne sont pas suffisants pour éliminer les nombreux virus en multiplication. Il se peut que la souche ayant infecté le veau *in utero* subisse des mutations si bien qu'elle devienne une souche cytopathogène. Il développe alors ce que l'on appelle la maladie des muqueuses. En effet, seule cette souche peut être à l'origine de la maladie des muqueuses (Grooms *et al.*, 2004). Le nouveau virus est antigéniquement apparenté à celui qui l'a infecté *in utero*, donc aucune réaction immunitaire ne se met en place. De ce fait, cette maladie est toujours mortelle. Les veaux IPI sont également immunodéprimés et donc plus susceptibles de contracter d'autres affections.

Le mécanisme d'apparition d'IPI n'est pas encore totalement élucidé. Il semblerait que les protéines virales soient reconnues comme des antigènes du soi. Il en résulte une immunotolérance de la part des lymphocytes spécifiques B et T (Grooms *et al.*, 2004).

Si la vache gestante est infectée par une souche non cytopathogène entre le 100ème et le 150ème jour de gestation, le veau peut présenter diverses malformations.

Selon Grooms, cela est dû que fait que, durant cette période, l'organogenèse est en cours et le veau n'est pas encore immunocompétent. Le mécanisme pathogénique n'est pas encore clair mais il semblerait que cela soit dû à une combinaison entre une atteinte directe des cellules par le virus et à la réponse inflammatoire causée par le virus (Grooms *et al.*, 2004).

Enfin, après 4 mois de gestation et jusqu'au terme, le fœtus peut se défendre et éliminer le virus de la même façon qu'un adulte. L'infection est donc inapparente pour le fœtus (Goyal *et al.*, 2005).

La BVD est marquée par des troubles de la reproduction, principalement des avortements, de la mortalité embryonnaire, des malformations fœtales et une baisse de la fertilité. Un avortement dû au virus de la BVD a été, pour la première fois, décrit en 1946 par Olafson (Olafson *et al.*, 1946).

L'avortement peut survenir à tout moment de la gestation mais arrive le plus fréquemment au cours du premier trimestre. Il a souvent lieu dans les 10 à 27 jours suivant l'infection et l'expulsion du fœtus se fait dans les 50 jours qui suivent (Grooms *et al.*, 2004).

Les principales lésions placentaires et fœtales ont été décrites par Murray. Il a examiné 40 fœtus et placentas issus de mères infectées par le virus de la BVD. Les lésions placentaires n'étaient pas spécifiques d'une atteinte par le virus de la BVD. Dans tous les cas elles n'étaient pas suffisantes pour entraîner l'avortement (Murray, 1991). Selon Grooms, les lésions placentaires lors de BVD consistent en une vasculite, de l'œdème, des phénomènes de congestion et d'hémorragies, et de la nécrose (Grooms *et al.*, 2004).

Murray a montré que les lésions fœtales causées par le virus de la BVD se trouvaient principalement sur les poumons et le myocarde. Les lésions pulmonaires consistent en une infiltration de cellules mononucléées créant une inflammation autour des bronchioles et au sein des tissus inter-alvéolaires (Murray, 1991). Une myocardite nécrosante associée à une vasculite non suppurative peut être observée. De plus, certains fœtus présentent une hypoplasie ou une dysplasie rénale et pulmonaire (Anderson *et al.*, 2007). Enfin, il est courant d'observer des malformations congénitales comme celles décrites dans le paragraphe sur les symptômes reproducteurs (Anderson *et al.*, 2007).

Le virus de l'IBR

Le virus de l'IBR (rhinotrachéite infectieuse bovine) est un *Herpes virus* de type 1. Il s'agit d'un virus enveloppé d'environ 150nm de diamètre. Son support génétique est une molécule bicaténaire d'ADN (Murphy *et al.*, 1999).

Puisqu'il est enveloppé, le virus de l'IBR est sensible à la plupart des désinfectants couramment utilisés (ammoniums quaternaires, dérivés phénoliques et formol) (Thiry *et al.*, 1997).

La pénétration du virus dans l'organisme est facilitée lors d'atteinte des muqueuses (Murphy *et al.*, 1999). Suite à l'infection, le virus peut emprunter trois voies de dissémination : la circulation sanguine, le système nerveux et la transmission de cellule à cellule. Lorsque le virus

se propage de cellule à cellule, il ne s'expose pas aux anticorps et il est donc protégé de la phagocytose (Thiry *et al.*, 1997).

La première infection est suivie d'une virémie puis d'une dissémination à de nombreux organes comme les organes du tractus digestif, les ovaires, la mamelle ou même le fœtus (Thiry *et al.*, 1997).

Il peut se passer un temps de latence avant l'expression des signes cliniques. Les particules virales sont alors situées au niveau du ganglion sacré ou trijumeau respectivement lors d'atteinte génitale ou respiratoire (Murphy *et al.*, 1999).

La réplication et l'encapsidation du virus se fait dans le noyau de la cellule. L'enveloppe est acquise suite à sa sortie de la cellule infectée par exocytose (Murphy *et al.*, 1999).

Le virus de l'IBR présente une distribution mondiale (OIE, 2013). L'infection sub-clinique à IBR semble fréquente en Europe (Thiry *et al.*, 1997). De nombreux pays européens ont mené des programmes en vue d'éliminer l'IBR des élevages bovins et un grand nombre d'entre eux sont maintenant indemnes.

En France, le virus de l'IBR est considéré comme un agent abortif majeur, puisqu'il fait partie, avec *Neospora caninum* et le virus de la BVD, des trois agents abortifs les plus fréquemment mis en évidence (GDS, 2013).

Le virus BHV-1 peut adhérer à la zone pellucide de l'ovocyte ou de l'embryon. Mais il n'interfère pas directement avec le développement embryonnaire. Il présente en revanche un effet marqué sur le corps jaune. Il est, en effet, à l'origine d'une nécrose hémorragique focale ou généralisée. Une nécrose des follicules ovariens peut également être observée (Thiry *et al.*, 1997).

Le virus atteint le fœtus en passant la barrière transplacentaire. Le fœtus, incapable de développer une réponse immunitaire suffisante, meurt et est expulsé par la vache. L'avortement survient de quelques jours à quelques semaines après l'infection (Thiry *et al.*, 1997).

L'infection par l'IBR peut être à l'origine d'avortements. L'avortement est dû à une atteinte secondaire du fœtus. La mort fœtale survient en 15 à 65 jours. Les avortements sont plus fréquemment rencontrés lors du dernier trimestre de gestation (FEADER, 2010).

On peut également observer des mortalités néonatales jusqu'à 12 jours après la naissance (Thiry *et al.*, 1997).

La forme génitale de l'IBR est caractérisée par une vulvovaginite pustuleuse accompagnée d'anorexie et de dépression. Les mictions sont fréquentes et douloureuses. Les lèvres vulvaires sont enflées et des pustules sont présentes sur le plancher vaginal. Celles-ci peuvent devenir

coalescentes et être recouvertes d'une pseudo-membrane fibrineuse. Des sécrétions vulvaires peuvent également être présentes (Murphy *et al.*, 1999).

La phase aiguë de la maladie dure de quatre à cinq jours et la guérison s'opère généralement en une quinzaine de jours (Murphy *et al.*, 1999).

Des cas de métrites dues au virus de l'IBR survenant après une césarienne ont été décrits dans des élevages de vaches blanc-bleu belges. Les vaches sont en effet plus réceptives au virus pendant la période du vêlage (Thiry *et al.*, 1997).

Le taureau peut présenter une balanoposthite. Les lésions sont sévères et extensives à tel point que le taureau peut refuser la saillie (Murphy *et al.*, 1999).

L'autolyse placentaire qui peut être observée n'est pas caractéristique d'une atteinte par le virus de l'IBR. Il n'existe pas d'autres lésions placentaires qui sont caractéristiques d'une atteinte par le virus de l'IBR (Lefèvre, 2010).

Le virus de l'IBR est responsable de l'apparition de lésions de nécrose multifocales, elles sont surtout visibles sur le foie. Le cortex rénal est souvent détruit (Thiry *et al.*, 1997).

La maladie survient généralement après un stress qui lève l'état de latence. Cet équilibre peut être rompu par la gestation, la parturition, un transport, une infestation parasitaire ou l'arrivée dans un nouveau lot de vaches (Murphy *et al.*, 1999) (Thiry *et al.*, 1997).

Un traitement à base de corticoïdes peut également entraîner la levée de l'état de latence pour l'IBR. Hage a réactivé la circulation de l'IBR au sein d'un troupeau laitier suite à l'injection de dexaméthasone sur trois vaches séropositives. Après 7 semaines, toutes les vaches du troupeau qui étaient séronégatives ont subi une séroconversion et certaines vaches qui étaient séropositives ont vu leur titre en anticorps dirigés contre le virus de l'IBR augmenter de façon significative (Hage *et al.*, 1996).

La plupart des animaux atteints ne développent pas de signes cliniques liés à l'IBR. La principale raison est que la souche en jeu est souvent peu virulente. Mais ces animaux sont néanmoins excréteurs du virus et constituent un danger pour les autres bovins (Thiry *et al.*, 1997).

Le virus de Schmallerberg

Le virus de Schmallerberg est nommé SBV. Il fait partie du genre *Orthobunya virus* et de la famille des *Bunyaviridae*. Il présente de grandes similitudes avec le virus Akabane (138).

Son génome est constitué de 3 fragments d'ARN monocaténaire négatif. Il est sphérique et enveloppé. Il mesure entre 80 et 120 nm (Doceul *et al.*, 2013).

Les particules virales sont constituées de 4 protéines structurales : 2 glycoprotéines de surface *Gn* et *Gc*, la polymérase *L* et la nucléoprotéine *N*. Les deux dernières protéines permettent la transcription et la réplication du virus (Doceul *et al.*, 2013).

La réplication du SBV est strictement intra-cytoplasmique. Les protéines de surface *Gn* et *Gc* reconnaissent dans un premier temps un récepteur cellulaire. Les particules virales pénètrent dans la cellule par endocytose. L'enveloppe virale et la membrane d'endocytose fusionnent et le matériel génétique est libéré dans le cytoplasme. La transcription et réplication virale peut alors s'opérer. L'assemblage des particules virales a lieu au niveau des membranes de Golgi. Les particules virales en position intra-vésiculaire parviennent ensuite jusqu'à la membrane cellulaire où un phénomène d'exocytose se produit (Doceul *et al.*, 2013).

Peu d'éléments sont connus concernant la pathogénie du SBV. Elle dépend des facteurs de virulences codés par les 3 séquences génétiques (Doceul *et al.*, 2013).

Des résultats d'histopathologie suggèrent que le SBV a un tropisme marqué pour les cellules nerveuses notamment les neurones (Doceul *et al.*, 2013).

En décembre 2011, des malformations menant à une mort fœtale *in-utero* ou survenant rapidement après la mise-bas ont été rapportées en Allemagne (138). Le principal signe clinique observé est l'avortement (Doceul *et al.*, 2013).

L'examen du placenta ne permet pas de suspecter l'intervention du virus de Schmallenberg car les lésions ne sont pas spécifiques de ce virus.

Herder a examiné 40 avortons ovins, 2 avortons caprins et 16 avortons bovins afin de déterminer les lésions les plus fréquemment observées lors d'atteinte par le SBV (qui a été confirmée par un résultat positif à la Rt-PCR) (Herder *et al.*, 2012).

Les troubles nerveux se caractérisent cliniquement par une amaurose, une ataxie et/ou des troubles comportementaux. Les troubles nerveux sont tels que les nouveau-nés ne survivent que quelques heures (Doceul *et al.*, 2013).

A l'examen histopathologique, on retrouve une méningo-encéphalomyélite lympho-histiocytaire et parfois une dégénérescence neuronale ainsi qu'une nécrose du système nerveux central. On trouve également une hypoplasie des cellules musculaires squelettiques dont les cellules myocardiques ((Herder *et al.*, 2012).

Le virus a été mis en évidence dans un premier temps en décembre 2011 en Allemagne, aux Pays-Bas et en Belgique. Puis début 2012, il a été mis en évidence au Royaume-Uni, en France, en Italie, au Luxembourg, en Espagne, au Danemark et en Suisse. Fin avril 2012, le SBV avait été détecté dans 3 628 troupeaux européens. Durant l'automne et l'hiver 2012-2013, des cas se

sont déclarés, principalement en Europe du nord : Irlande du Nord, Suède, Finlande. Fin octobre 2012, on recensait 6 000 troupeaux ayant été touchés par le SBV (Doceul *et al.*, 2013).

Plusieurs études de prévalence ont été menées à différentes étapes de la dissémination du virus. La réalisation d'analyses sérologiques aux Pays-Bas durant l'hiver 2011-2012 a montré une prévalence sérologique de 72,5%. Une autre menée en Belgique entre février et avril 2012 montrait une prévalence sérologique de 91% (Doceul *et al.*, 2013).

Des études françaises réalisées par l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) au laboratoire d'Alfort à partir de la technique ELISA et de la viro-neutralisation montraient une nette différence entre le nord et le sud de la France, respectivement entre 32,0 et 100,0% et entre 7,5 et 14,9%. Cela confirme le schéma épidémiologique proposé (Doceul *et al.*, 2013).

III. Les protozoaires à l'origine d'avortements bovins

Neospora caninum

Neospora caninum est un protozoaire intra-cellulaire obligatoire proche de *Toxoplasma gondii* (Ortega-mora *et al.*, 2007).

N. caninum présente un cycle hétéroxène. Ses hôtes définitifs sont les canidés et plus précisément le chien, le renard et le coyote. De nombreuses espèces sont des hôtes intermédiaires du parasite : les bovins, les cervidés et les buffles (Ortega-mora *et al.*, 2007).

Ce parasite se présente sous diverses formes selon l'étape du cycle de reproduction : tachyzoïte, bradyzoïte ou sporozoïte.

L'hôte intermédiaire se contamine en ingérant des oocystes sporulés présents dans l'environnement. Après leur ingestion, ils deviennent des tachyzoïtes puis des bradyzoïtes. Ces deux formes se multiplient de façon asexuée. Le tachyzoïte peut infester le fœtus en passant la barrière placentaire. Les bradyzoïtes sont présents dans des kystes localisés au niveau des tissus nerveux de l'hôte. Ils correspondent à la forme de résistance du parasite chez l'hôte intermédiaire (Ortega-Mora *et al.*, 2007).

L'hôte définitif, un canidé, se contamine par ingestion de tissus contenant des kystes à bradyzoïtes. Des sporozoïtes se multiplient alors de façon sexuée au sein de l'hôte définitif et sont excrétés dans les fèces sous forme d'oocystes non sporulés (Ghalmi *et al.*, 2007). La sporulation se fait dans le milieu extérieur, et il s'agit de la forme infectieuse de *Neospora caninum* pour les hôtes intermédiaires (Lefèvre, 2010).

Cet agent abortif présente une distribution mondiale (Anderson *et al.*, 1994). Une comparaison entre différentes études portant sur la prévalence des agents infectieux abortifs montre que la néosporose est une cause majeure d'avortement, puisqu'elle serait impliquée dans 18,0 à 24,4% des cas d'avortements (Anderson *et al.*, 1994). Il fait partie des trois agents infectieux les plus fréquemment impliqués dans les avortements bovins en France (GDS, 2013).

L'avortement néosporosique peut présenter deux origines : la première correspond à la transmission endogène transplacentaire. Durant la gestation, les bradyzoïtes sont réactivés et ils se différencient en tachyzoïtes. Ils atteignent l'utérus puis le fœtus via la circulation de cellules phagocytaires ayant intégré le parasite (Lefèvre, 2010). La deuxième voie de contamination est la transmission exogène transplacentaire. Elle résulte de l'ingestion d'oocystes. Les sporozoïtes se différencient alors en tachyzoïtes qui contaminent de nombreux organes dont l'utérus. Le parasite peut passer par voie transplacentaire et atteindre le fœtus (Lefèvre, 2010).

Selon le stade de gestation pendant lequel le fœtus est atteint, il aura, ou non, développé son immunocompétence et il pourra mourir ou survivre (Lefèvre, 2010). Il semblerait que l'acquisition de l'immunocompétence se fasse aux alentours du 150^{ème} jour de gestation. Après cette date, le fœtus serait plus apte à éliminer le parasite et à survivre. La mise en évidence de *N. caninum* est en effet plus fréquente et la réaction inflammatoire est moindre chez les fœtus atteints en début de gestation. Cela suggère une incapacité du fœtus à lutter contre *N. caninum* (Gibney *et al.*, 2008). Si le fœtus survit, il restera porteur à vie du parasite. Pour les femelles reproductrices, elles pourront contaminer leur fœtus dès les débuts de la gestation (Lefevre, 2010).

En dehors de l'atteinte directe du fœtus par le parasite, une autre hypothèse est avancée concernant l'arrêt de la gestation lors de néosporose. La réponse immunitaire développée par la mère se traduit par un recrutement de cellules T cytotoxiques et de cytokines pro-inflammatoires dans l'utérus. Cela serait incompatible avec le maintien de la gestation (Gibney *et al.*, 2008).

Lors de la gestation, la vache peut transmettre *N. caninum* à son fœtus par deux voies de contamination : la voie endogène ou exogène transplacentaire. Le fœtus sera alors infesté par ce parasite et selon le stade de la gestation, sera plus ou moins capable de se défendre.

Paré a observé que la probabilité d'infection congénitale d'un veau ne dépendait pas de son sexe, de la durée de la gestation, de l'âge de sa mère, de son nombre de lactations ni de l'existence d'un précédent avortement (Paré *et al* 1996).

Mais la probabilité d'être infesté de façon congénitale dépend du taux d'anticorps dirigés contre *N. caninum* chez la mère au moment de la mise-bas : plus celui-ci est élevé, plus le veau a de chances d'avoir été infesté au cours de la gestation (Paré *et al.*, 1996).

Plusieurs situations épidémiologiques peuvent être observées.

La première correspond à la survenue d'avortements sporadiques : ils concernent moins de 3% des femelles (Lefèvre, 2010).

La deuxième situation correspond à des avortements enzootiques concernant plus de 3% des vaches. Ils surviennent à tout moment de l'année (Lefèvre, 2010).

Enfin, on peut observer des avortements en série : plus de 10% des animaux sensibles avortent sur une période de 2 à 3 mois. Cette dernière forme d'avortements serait due à l'ingestion d'ookystes par des vaches gestantes (Lefèvre, 2010).

Gibney a examiné les placentas de 12 vaches infestées expérimentalement, la moitié à 70 jours de gestation et l'autre moitié à 210 jours de gestation (Gibney *et al.*, 2008).

L'examen des placentas des vaches du premier groupe a montré une nécrose multifocale des cellules épithéliales des placentomes. Les tissus fœtaux et maternels étaient tous deux atteints. *N. caninum* a été observé dans des cellules épithéliales trophoblastiques en dégénérescence et dans des cellules endométriales nécrotiques. Une infiltration lymphocytaire modérée est présente à la base des caroncules utérines. Dans la plupart des placentomes examinés, des hémorragies et accumulations focales de sérum étaient présentes entre les couches cellulaires maternelles et fœtales (Gibney *et al.*, 2008).

Les lésions observées sur les placentas issus des vaches infestées au 210ème jour de gestation se limitent à des foyers de nécrose en nombre limité. Lorsque ces lésions étaient présentes, on pouvait observer une infiltration lymphocytaire modérée dans les tissus maternels (Gibney *et al.*, 2008).

Il semblerait que les lésions placentaires observées lors d'infestation tardive soient due à une nouvelle contamination du placenta à partir du fœtus qui est immunocompétent et qui élimine le parasite (Gibney *et al.*, 2008).

Les fœtus atteints par *N. caninum* présentent généralement une autolyse modérée. Les fœtus atteints au début de la gestation sont parfois momifiés et sont expulsés quelques semaines après leur mort (Lefèvre, 2010).

Les lésions fœtales les plus fréquemment observées sont une encéphalite multifocale non suppurative et une myocardite. Si cette dernière est suffisamment marquée, elle suffit à provoquer la mort du fœtus (Lefèvre, 2010).

Gibney a examiné les fœtus obtenus suite à l'infestation expérimentale de 12 vaches, la moitié à 70 jours de gestation et l'autre à 210 jours.

L'examen des fœtus issus des mères infestées avant 70 jours de gestation a montré que la principale lésion observée était de la nécrose. Elle était plus marquée sur le cerveau, la moelle épinière et le foie. Les lésions étaient multifocales à coalescentes. D'autres foyers de nécrose plus limités ont été mis en évidence sur : le myocarde, les cellules tubulaires rénales, le parenchyme pulmonaire et pancréatique, les cellules du thymus, de la rate et de la moelle osseuse. Les foetus ne montraient pas de signes d'inflammation à l'inverse de ceux issus du deuxième groupe de vaches (Gibney *et al.*, 2008).

Les principaux changements histopathologiques observés sur les fœtus issus des mères infectées au 210ème jour de gestation se limitent au cerveau et à la moelle épinière. Les lésions observées sont une encéphalomyélite et une infiltration de cellules mononuclées dans la moelle épinière (Gibney *et al.*, 2008).

La lésion histologique fœtale la plus caractéristique est une myélite multifocale non suppurative (Anderson *et al.*, 1994).

L'infection à *N. caninum* peut résulter de l'ingestion de tissus contaminés par des kystes bradyzoïtes, d'une contamination transplacentaire ou de l'ingestion d'oocystes (Ghalmi *et al.*, 2007 ; Gibney *et al.*, 2008).

Des avortements néosporosiques ont été décrits dans les élevages laitiers et allaitants mais la prévalence de ces avortements est plus importante dans les élevages laitiers. Il semblerait que cela soit dû au fait que les vaches laitières reçoivent toute l'année une ration alimentaire pouvant être contaminée par des fèces de canidés contenant des oocystes (Anderson *et al.*, 1994).

Mais, les canidés infestés excréteraient peu d'oocystes dans leurs fèces et la dose nécessaire d'oocystes pour provoquer l'infestation des bovins est assez élevée. Ces deux éléments permettent de supposer que les canidés jouent un rôle assez faible dans la transmission du parasite. La transmission verticale est la voie de transmission la plus fréquente (Lefèvre, 2010). Paré a observé que la probabilité de donner naissance à un veau infesté de façon congénitale ne dépendait pas de l'âge de la mère. En effet, la prévalence de la néosporose ne diffère pas selon les classes d'âges. Ceci est donc en faveur d'un mode de transmission de la néosporose s'effectuant principalement par voie verticale (Paré *et al.*, 1996).

Davison a observé qu'une vache séropositive avant la gestation avait 95,2% de chances de donner naissance à un veau séropositif avant qu'il ait bu du colostrum, donc de transmettre le parasite par voie transplacentaire (Davison *et al.*, 1999).

Paré a étudié la prévalence de la néosporose dans deux élevages laitiers en Californie. Ils ont montré que 81% des vaches séropositives (soit 93/115) et 5% des vaches séronégatives (soit 8/170) ont donné naissance à des veaux infestés de façon congénitale par *N. caninum* (Paré *et al.*, 1996).

D'autres voies de transmission de *N. caninum* ont été décrites : ingestion de tachyzoïtes présents dans le colostrum par des veaux et une transmission par le sperme (Ghalmi *et al.*, 2007 ; Lefèvre, 2010).

Tritrichomonas foetus

L'agent à l'origine de la trichomonose est *Tritrichomonas foetus*, anciennement appelé *Trichomonas foetus*. Il s'agit d'un protozoaire. Il existe trois sérotypes différents et les bovins présentent des réactions immunologiques croisées vis-à-vis de ces trois agents (Rae, 2006).

T. foetus mesure environ 20µm de longueur. Il contient un unique noyau et quatre flagelles. La présence d'une membrane ondulante avec 3 à 5 vagues permet de le reconnaître au microscope optique (Rae *et al.*, 2006).

T. foetus est peu résistant dans le milieu extérieur mais il peut survivre quelques jours dans des sécrétions génitales lors de températures extérieures positives (Euzéby, 1986).

T. foetus se multiplie par scission binaire au sein du tractus génital. Il reste cependant en position superficielle et n'envahit pas l'épithélium, on le trouve uniquement à la surface des muqueuses et dans les sécrétions génitales (Ortega-mora, 2007).

Il est présent de façon chronique chez le taureau au sein des cryptes épithéliales du pénis et du prépuce et il est transmis à la vache lors de monte naturelle (Ortega-mora, 2007).

T. foetus présente une distribution mondiale. Des études aux États-Unis ont montré que la prévalence de cette affection pouvait atteindre 27% des taureaux (Anderson *et al.*, 1994). Cette valeur a beaucoup diminué grâce à la généralisation de l'insémination artificielle chez les vaches laitières. Cependant la pratique actuelle qui consiste à utiliser des taureaux afin de limiter les problèmes de reproduction dans certains élevages laitiers va sans doute contribuer à la ré-augmentation de cette prévalence.

Une infestation expérimentale par *T. foetus* a été réalisée par Skirrow sur 4 génisses. Il a inoculé *T. foetus* par voie intra-vaginale et a montré que les protozoaires se disséminaient dans l'utérus dans la première semaine suivant l'inoculation. Ils étaient ensuite détectés dans les sécrétions génitales 13 à 28 semaines plus tard (Shirrow *et al.*, 1990).

En effet, après saillie entre un taureau infecté et une vache saine, le parasite atteint l'utérus par passage du col. *T. foetus* contamine ensuite l'ensemble du tractus génital de la vache en une à

deux semaines. On peut alors observer des avortements et des pyomètres. Le pyomètre résulte d'une persistance du corps jaune gestatif suivie d'une importante sécrétion purulente par l'endomètre (Rae *et al.*, 2006).

T. fetus interfère avec la fécondation et le développement embryonnaire. Il s'agit principalement d'avortements précoces survenant entre 50 et 70 jours de gestation. Les principaux signes cliniques observés chez la vache sont des retours en chaleurs décalés et une augmentation de l'intervalle vêlage-insémination fécondante (Rae *et al.*, 2006).

Une très faible proportion de vaches reste porteuse du parasite c'est-à-dire le conserve d'une gestation à une autre. Cela concerne moins de 1% des vaches infestées. Elles constituent cependant des sources de contamination possibles de nouveaux taureaux (Rae *et al.*, 2006).

Le bovin mâle est le plus souvent porteur chronique asymptomatique. *T. fetus* est localisé au niveau des cryptes épithéliales du pénis et du prépuce. L'infestation par *T. fetus* n'altère pas la qualité de son sperme ni sa capacité à saillir des vaches. Il est possible, de façon exceptionnelle, d'observer des sécrétions génitales purulentes dans les deux premières semaines suivant l'infection (Rae *et al.*, 2006).

Il semblerait que *T. fetus* ait un effet cytotoxique et hémolytique. Une protéine de type « adhésine » permettrait au parasite d'adhérer aux cellules et d'exercer son effet cytolytique (Rae *et al.*, 2006).

L'inoculation de *T. fetus* en position intra-utérine sur une vache gestante a entraîné un avortement 20 jours plus tard. Le parasite a été mis en évidence dans les liquides fœtaux. Cela permet de supposer que *T. fetus* a un effet abortif (Fitzgerald *et al.*, 1958).

La survenue d'avortements et de pyomètres sont les premiers signes cliniques observables lors de trichomonose. Ils ne concernent en revanche que 5% au maximum des vaches du troupeau. Les principaux effets de *T. fetus* sont sub-cliniques. Il s'agit principalement d'une baisse de fertilité liée à une mortalité fœtale précoce, des retours en chaleurs décalés et une augmentation de l'intervalle vêlage-insémination fécondante (environ 98 jours supplémentaires par rapport à une vache saine) (Rae *et al.*, 2006).

Les avortements sont souvent précoces : entre 50 et 70 jours de gestation, mais ils peuvent survenir jusqu'au 8ème mois de gestation. L'expulsion du fœtus a lieu entre 4 semaines et 4 mois après sa mort *in utero*. Après l'avortement, il est possible d'observer une rétention annexielle suivie d'une endométrite purulente ou catarrhale. La vache peut alors devenir stérile en raison de la destruction de la muqueuse utérine (Anderson *et al.*, 1994).

Des placentas ont été examinés lors d'une étude réalisée par Rae. L'invasion du chorion par *T. fetus* a été mise en évidence sur la plupart des placentas. Sur certains placentas, on pouvait

observer une infiltration modérée du tissu placentaire par des cellules inflammatoires constituées principalement de cellules mononucléées (Rae *et al.*, 2006).

Des lésions de bronchopneumonie pyogranulomateuse associées à la présence de *T. fetus* dans les voies aériennes ont été mises en évidence sur des fœtus issus d'avortements dus à la trichomonose. *T. fetus* a également été mis en évidence sur des coupes d'œsophage, de caillette et d'intestins. Une nécrose hépatique a aussi été observée (Rae *et al.*, 2006).

IV. Diagnostic des causes d'avortements d'origine infectieuse

Lorsqu'on veut diagnostiquer les causes infectieuses d'avortement, on peut d'une part analyser les signes cliniques et d'autre part faire appel à des examens complémentaires de laboratoire. Par ailleurs, il faut signaler que généralement les animaux qui avortent sont pour la plupart asymptomatiques et par conséquent, si on veut avoir des données épidémiologiques sur la prévalence ou l'incidence de l'infection, les tests de laboratoire sont très utiles. Ce chapitre passe en revue les différentes méthodes de diagnostic utilisées pour la détection des principaux agents abortifs.

Outre les signes cliniques, le diagnostic repose sur la sérologie ou sur la recherche du pathogène par culture, immunohistochimie, PCR ou encore par des tests sur animaux.

Brucella abortus

Le diagnostic a pour but de rechercher l'infection brucellique, d'en connaître la prévalence et la distribution et, pour les pays où l'éradication est acquise, de surveiller l'absence de recontaminations. Il met en jeu des épreuves sérologiques et allergiques, et la recherche de l'agent par bactériologie.

Le diagnostic sérologique utilise des épreuves de base, destinées au dépistage de masse, associées à des épreuves complémentaires pour élucider le cas des réponses douteuses. Les prélèvements intéressent le sang, pris sur l'animal vivant et à l'abattoir, et le lait. Il est possible de mettre en évidence la présence d'anticorps à partir de 30 jours après l'infection et jusqu'à 3 à 6 mois. Chez les jeunes bovins femelles, il faut parfois attendre la première mise-bas pour pouvoir détecter des anticorps (Ganière, 2010).

Néanmoins, il est à indiquer la présence d'une communauté antigénique avec *Yersinia enterocolitica* O9 rendant difficile l'interprétation des résultats.

Il existe de nombreuses techniques sérologiques de mise en évidence de la brucellose : la méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) indirecte, l'épreuve à l'antigène tamponné (EAT) et la méthode de fixation du complément (FC) (Bachy, 2012), La séro-

agglutination lente en tubes (SAW), Le test au Rose Bengale (RBT), Le test de l'anneau ou ring test (RT) (Fensterbank, 1986).

La méthode ELISA indirecte permet la mise en évidence, dans le sérum, d'anticorps spécifiques à la brucellose.

L'épreuve à l'antigène tamponné met en évidence les anticorps dirigés vers le LPS des brucelles, il s'agit des IgG1 et IgM (immunoglobulines G1 et M) (Ganière, 2010).

La méthode de fixation du complément permet de détecter les IgG1 et les IgM. On considère que la réaction est positive quand le titre de sérum est supérieur à 20 unités CEE sensibilisatrices/ml. La fixation du complément est moins sensible mais plus spécifique que l'épreuve à l'antigène tamponné. Cette méthode est utilisée pour confirmer des sérums positifs ou douteux aux tests précédents (Ganière, 2010).

Le test au Rose Bengale (RBT) est une agglutination rapide sur lame de sérum pur avec un antigène coloré et à pH 3,6. C'est l'épreuve de base pour vingt-trois pays sur les trente qui disent l'utiliser. On observe donc un large consensus sur l'utilisation de cette épreuve. Ce consensus paraît justifié dans la mesure où le RBT est un test économique, simple et rapide, donnant peu de faux résultats négatifs ou positifs obligeant à une FC de contrôle (ou SAW + FC) (Davies, 1971). Les immunoglobulines responsables de la réaction sont les IgG1 (Corbel, 1972) comme pour la FC, et parfois les IgM en fonction du mode de préparation de l'antigène. Ce test dépiste l'infection plus précocement que la SAW (Davies, 1971), en même temps que la FC (Nicoletti, 1969), ou parfois avant la FC ((Fensterbank, 1973).

D'autres techniques non sérologiques peuvent également être mises en œuvre : la méthode PCR et le dépistage allergique. Le dépistage allergique consiste en une épreuve cutanée allergique (ECA) à la brucelline. Après injection intradermique de la brucelline, il faut vérifier 72 heures après, l'apparition ou non d'un pli cutané supérieur à 2 millimètres. Cette méthode présente l'inconvénient d'entraîner de nombreux faux négatifs (seuls 60 à 80 % des bovins infectés réagissent) mais elle est très spécifique (spécificité autour de 100%) (Ganière, 2010).

Mais, le diagnostic de certitude de la brucellose repose sur l'isolement bactériologique à partir de sécrétions vaginales, lait, tissus de l'avorton, membranes fœtales, sperme ou liquide articulaire. Cette technique est cependant plus longue et difficile à réaliser (Ganière, 2010).

La majorité des pays pratique la recherche bactériologique des *Brucella*. Cette recherche est faite principalement à l'occasion des avortements dont la déclaration est le plus souvent obligatoire.

La décharge vaginale, le colostrum, l'avorton et le placenta contiennent alors une très grande quantité de *Brucella* chez les animaux infectés.

La recherche et l'identification bactériologique des *Brucella*, complémentaire des méthodes immunologiques, sont indispensables à une évaluation correcte du statut épidémiologique des troupeaux ou groupes humains. L'identification des *Brucella*, espèces et biovars, a beaucoup progressé grâce à l'utilisation d'une série de bactériophages, étudiés dans plusieurs pays. Une identification correcte est donc devenue accessible à des laboratoires non spécialisés. L'information apportée par le typage ou la mise en évidence de caractères marqueurs rares permet de connaître et de tracer les sources de l'infection.

Coxiella burnetii

Le diagnostic direct de cette bactérie peut être réalisé à partir de différents types de prélèvements. Les échantillons peuvent être obtenus à partir d'avortons, de placenta et d'écoulements vaginaux juste après l'avortement ou la parturition. Le lait de mélange, le lait individuel ou le colostrum ainsi que les échantillons de matières fécales peuvent aussi être étudiés (Fournier *et al.*, 1998). La coloration se fait sur des frottis préparés à partir de placentas, d'écoulements vaginaux, d'avortons ou d'autres organes connus cibles pour *Coxiella burnetii* (poumons, foie et nœuds lymphatiques) ou à partir de calques réalisés à partir de ces organes (Quinn *et al.*, 1994). Plusieurs colorations sont utilisées, Stamp, Ziehl-Neelsen, Gimenez, Giemsa, Macchiavello et Koster (Quinn *et al.*, 1994 ; Guatteo *et al.*, 2006). La bactérie apparaît en coccobacilles de très petite taille (0,3 à 1,5 µm de long x 0,2 à 0,4 µm de large) colorées en rose sur un fond bleu ou vert par la coloration de Stamp (Quinn *et al.*, 1994). *Coxiella burnetii* peut être confondue avec *Chlamydophila abortus* ou *Brucella spp.* La corrélation entre l'examen direct par coloration et la sérologie est nécessaire (Quinn *et al.*, 1994).

L'immunodétection est une analyse immunoenzymatique ou immunofluorescente réalisée sur des tissus fixés à l'acétone ou inclus dans la paraffine (Raoult *et al.*, 1994). L'analyse fait appel à des anticorps polyclonaux dirigés contre *Coxiella burnetii* et à un conjugué anti-IgG anti-espèce marquée avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) ou de la peroxydase utilisée comme marqueurs pour visualiser la bactérie (Fournier *et al.*, 1998).

La Polymérase Chain Réaction (PCR) est une technique hautement spécifique, rapide et sensible. La PCR vise à détecter l'ADN de *Coxiella burnetii* dans l'échantillon, l'amplifier pour qu'il soit enfin détecté. Cette technique est applicable avec n'importe quel type de prélèvement

(Beaudeau *et al.*, 2006). A l'heure actuelle, les recherches ont développé des technique PCR multiplex permettant d'amplifier simultanément plusieurs microorganismes et des techniques PCR temps réel dans le but d'estimer la charge bactérienne dans les échantillons (Berri *et al.*, 2009).

Cette technique a permis aux chercheurs d'élucider certains points dans la pathogénie de *Coxiella burnetii* surtout en ce qui concerne les voies de sécrétion de la bactérie (technique capable de détecter une *Coxiella burnetii* par 1 ml de lait) (Guatteo *et al.*, 2006 ; 2007). Dans la médecine vétérinaire ou dans le dépistage épidémiologique, l'utilisation de la PCR reste très limitée vue son coût trop élevé.

L'isolement de *Coxiella burnetii* est rarement utilisé en médecine vétérinaire du fait de ses contraintes, car il s'agit d'une bactérie très virulente considérée comme très dangereuse pour l'être humain. De ce fait, sa manipulation exige des structures spécialisées ayant un niveau de confinement 3 (Spyridaki *et al.*, 2002).

La culture de cette bactérie se fait sur culture cellulaire ou sur œufs de poules embryonnés (Bouvery *et al.*, 2003). Des systèmes de microcultures cellulaires commercialisées sont développés pour ce fait. Après préparation d'une suspension d'échantillon, cette dernière est inoculée sur des fibroblastes embryonnaires de poumon humain (HEL). L'effet cytopathogène (ECP) caractéristique de *Coxiella burnetii* est examiné au 3^{ème}, 10^{ème} et 21^{ème} jour. Après le 10^{ème} jour, l'analyse directe par immunofluorescence est réalisable pour confirmer la présence de *C. burnetii*.

Pour avoir un isolat de la bactérie, des inoculations sont réalisées sur cellules VERO ou sur fibroblastes de souris L929 après vérification de l'inoculum par coloration de Gimenez et analyse PCR (Spyridaki *et al.*, 2002).

La culture sur œufs embryonnés de 5 jours se fait sur œufs de poule au niveau du sac vitellin. La récolte des sacs vitellins est réalisée après 10 à 15 jours d'incubation et des examens de frottis colorés à partir de ces sacs ou d'analyse PCR sont réalisés pour confirmer la présence de *Coxiella burnetii*. L'isolat pur de la bactérie est obtenu après passage répétés sur œufs (Ho *et al.*, 1995).

L'Inoculation aux animaux de laboratoire se fait par voie intrapéritoniale chez les souris et les cobayes. Les sérums sont collectés et analysés après 21 jours à la recherche d'anticorps anti-

Coxiella burnetii. Si au cours de la période d'incubation une augmentation de température corporelle est notée, la rate de l'animal est récupérée après son sacrifice servant ainsi pour l'isolement du germe sur culture cellulaire ou sur œufs embryonnés (Bouvery *et al.*, 2003). L'inoculation aux animaux de laboratoire est utilisée en utilisant des échantillons fortement contaminés, tels que les placentas, écoulements vaginaux, fèces ou lait (Bouvery *et al.*, 2003).

Le test de fixation du complément est la technique la plus utilisée en diagnostic vétérinaire pour la fièvre Q. Elle consiste en la recherche des anticorps anti-*Coxiella burnetii* dans le sérum, le lait ou le colostrum (Peter *et al.*, 1987).

La technique est réalisée sur des plaques permettant la fixation du complément aux anticorps que peut contenir l'échantillon. La méthode est considérée comme spécifique mais moins sensible par rapport à d'autres techniques (ELISA) (Fournier *et al.*, 1998). Selon les recommandations de l'OIE, après réalisation de plusieurs dilutions, des titres en anticorps anti-*Coxiella burnetii* entre 1/10 et 1/40 sont caractéristiques d'une infection latente. Des titres de 1/80 ou au-delà dans un ou plusieurs sérums provenant d'un groupe de 5 à 10 animaux révèlent une phase évolutive de l'infection (OIE, 2005).

La technique « Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay » connue par la technique ELISA est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (Walker et Rapley, 2008). Cette technique a une sensibilité élevée et une bonne spécificité (Fournier *et al.*, 1998 ; Rousset *et al.*, 2007). Il s'agit d'une technique fiable pour démontrer la présence d'anticorps dirigés contre *Coxiella burnetii* dans le sérum et le lait (Jaspers *et al.*, 1994). La technique exige un antigène pur, des trousse de diagnostic prêtes à l'emploi sont disponibles dans le commerce et peuvent détecter des anticorps de phase II ou de phase I et II de *Coxiella burnetii* (Waag *et al.*, 1995).

Salmonella

Le diagnostic de la salmonellose se fait principalement par culture de la bactérie à partir du placenta ou du foie de l'avorton (Bachy, 2012). Il peut également se faire par PCR sur prélèvement de contenu stomacal, sur foie du fœtus ou sur écouvillon vaginal. Le diagnostic peut être aussi sérologique ou nécropsique.

Les analyses bactériologiques se font d'abord par culture directe, enrichissement et ensemencement. L'ensemencement direct de tissus ou autres échantillons (fèces, lait) n'est

généralement pas recommandé à cause de sa très faible sensibilité, sauf peut-être dans les cas de salmonellose aiguë (Waltman, 2000). Afin d'augmenter la sensibilité de la culture, l'échantillon est d'abord incubé pour 18-24h dans un bouillon d'enrichissement sélectif (Nam et coll., 2004 ; Pangloli et coll., 2003). Ce dernier inhibera la croissance d'autres bactéries, tout en permettant la multiplication de *Salmonella* pour atteindre des quantités qui seront détectables après l'ensemencement sur gélose. Les trois types de bouillons d'enrichissement sont tétrathionate, sélénite et Rappaport-Vassiliadis (RV). Par la suite, l'échantillon peut être ensemencé sur une gélose légèrement sélective (MacConkey ou MAC, éosine et bleu de méthylène ou EMB), moyennement sélective (xylose-lysinedésoxycholate ou XLD, désoxycholate-citrate ou DCA, *Salmonella*-*Shigella* ou SS, Hektoen entérique ou HE) ou très sélective (sulfite de bismuth ou BS, vert brillant ou BGA) (Nataro et coll., 2007 ; Waltman, 2000). Les méthodes prévoient ensuite un isolement, qui consiste en un étalement sur boîtes de Pétri, contenant également des milieux sélectifs. Cela permet de visualiser les colonies caractéristiques, dont le nombre aura été considérablement augmenté durant les phases précédentes. Ces milieux doivent permettre au personnel de laboratoire une distinction facile entre salmonelles et non-salmonelles.

Actuellement, une trentaine de milieux gélosés d'isolement sont proposés sur le marché et une dizaine seulement permettent une culture différentielle de *Salmonella*. Ces milieux empêchent l'envahissement de la surface gélosée par des *Proteus*, limitent le développement de la plupart des bactéries autres que les *Salmonella* (Pardon et Sanchis, 1988). Une étape de confirmation qui va suivre l'isolement consiste en la sélection d'une ou plusieurs colonies caractéristiques en vue de leur purification pour une identification biochimique et sérologique.

L'identification biochimique peut être effectuée grâce à des galeries en tubes ou des systèmes d'identification standardisés du type galerie API 20E, ID 32E ou RAPID ID 32E, avec l'utilisation éventuelle d'un automate de lecture optique des cupules.

L'identification sérologique repose sur la recherche des antigènes Vi (somatiques d'enveloppe), O (somatiques) et H (flagellaires) des *Salmonella* et sur l'application du schéma de Kauffmann White. Elle est effectuée par des agglutinations sur lames avec les sérums appropriés à partir de souches bactériennes identifiées comme appartenant à *Salmonella*. La présence de deux sérovars différents sur un même prélèvement n'est pas rare.

De nouvelles techniques de détection de *Salmonella* spp dans les matières fécales bovines (Méthodes de référence) ont été mises au point. Il s'agit de la norme **NF U 47-100 (juillet 2007)** : recherche par isolement et identification de tout sérovars ou sérovars (S) spécifié (S) de salmonelles dans l'environnement des productions animales. Une des premières voies d'amélioration a résidé dans l'utilisation de milieux semi-solides, exploitant la propriété de mobilité de la plupart des salmonelles. De Smedt et collaborateurs (1986) ont montré une meilleure performance avec le milieu semi solide appelé « modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis » (MSRV) par rapport à un enrichissement classique avec le milieu tétrathionate.

Outre le fait de pouvoir disposer de résultats négatifs au bout de 48 h, le MSRV permet la détection d'un petit nombre de salmonelles présentes dans l'échantillon parmi une flore compétitrice importante (de l'ordre de 10 UFC2 / 25 g) (De Smedt et Bolderdijk, 1987).

L'ISO (« International Standard Organization ») a proposé également la norme **ISO 6579** destiné à mettre au point des méthodes applicables aux échantillons prélevés dans les exploitations. Ce projet prévoit l'utilisation de MSRV comme milieu d'enrichissement pour *Salmonella* [**ISO 6579**]

Récemment, une nouvelle formule a été proposée, dérivée du MSRV ; il s'agit du Diasalm. Son efficacité a été plusieurs fois comparée par rapport au milieu classique RV, et la comparaison s'est révélée en faveur du Diasalm (Landman *et al.*, 1996).

Plusieurs méthodes alternatives à la culture ont été développées ou sont en développement pour la détection de salmonella il s'agit à titre d'exemple des méthodes immunologiques.

Radio Immuno Assay, RIA : technique rarement utilisée en microbiologie alimentaire (Jay, 2005) car l'Ag est couplé à un isotope (¹²⁵I essentiellement) (Humber et Lahellec, 1991).

Immunofluorescence : un composé fluorescent tel que l'isothiocyanate de fluorescéine peut être fixé sur les anticorps anti-*Salmonella*. Lorsque les cellules bactériennes sont mises au contact de ces anticorps fluorescents, ces derniers se fixent sur la paroi ou les flagelles qui, à l'examen microscopique en UV, apparaissent fluorescentes (Cuq, 1993 ; Humber et Lahellec, 1991).

D'autres méthodes sérologiques : plusieurs méthodes sont évoquées pour la réalisation du diagnostic sérologique des infections salmonelliques (agglutination rapide sur lame, agglutination lente en tube ou en microplaque, ELISA). En ce qui concerne les espèces bovines

et ovines, l'épreuve de séroagglutination lente est la méthode à laquelle on fait appel à la recherche des anticorps spécifiques des Salmonelles (Caron *et al.*, 1997).

Plusieurs tests sérologiques ont été développés pour le dépistage des animaux infectés avec *S. dublin* ou *S. typhimurium*. La plupart de ces tests sont des ELISA qui détectent les immunoglobulines dirigées contre l'antigène O des LPS (Barrow, 2000). Il est également possible d'effectuer un ELISA sur le lait du réservoir afin de déterminer le statut d'un troupeau (Veling *et al.*, 2001).

Les Méthodes moléculaires utilisées pour le diagnostic des salmonelles sont basées sur l'**Électrophorèse des protéines** : technique de séparation des protéines cellulaires (enzymes) selon le poids moléculaire et la charge électrique (Bouvet, 2002) ; ce qui reflète indirectement l'expression du génome. L'analyse des électrophorégrammes obtenus par des logiciels issus de la micro-informatique permet une identification précise (Cuq, 1993). **Les Méthodes génotypiques** sont des méthodes basées sur la restriction enzymatique ou REA (Restriction Enzyme Analysis) : L'ADN, essentiellement chromosomal, des souches recherchées subit une digestion par une endonucléase appropriée de restriction qui clive l'ADN en des séquences nucléotidiques spécifiques (8 ; les fragments produits sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose ; le ribotypage (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) constituent les deux plus importantes techniques (Brisabois, 2001). **Les Méthodes basées sur l'amplification ou PCR** (Polymérase Chain Reaction), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Lan et Reeves, 2007), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) et l'hybridation ADN/ADN ou hybridation ADN/ARN ribosomaux sont des techniques rapides couplées à la PCR, largement utilisées pour la détection et l'identification des micro-organismes dans les aliments (Jay, 2005).

Chlamydomonas abortus

Chlamydia spp est un germe fragile dans le milieu extérieur. L'inconvénient du diagnostic direct est qu'il dépend des conditions de transport et de conservation de l'échantillon (Sachse *et al.*, 2008). Pour maintenir la vitalité des bactéries, l'échantillon est conservé à +4°C dans un milieu de transport approprié, tel que le saccharose / phosphate / glutamate ou SPG moyen supplémenté avec du sérum fœtal de veau additionné d'antibiotiques tel que la streptomycine (200 ug / ml), la gentamicine (50 pg / ml), la vancomycine (75 pg / ml) et la nystatine (25 unités / ml) (la pénicilline, les tétracycline et chloramphénicol inhibent la croissance des chlamydia et ne doivent pas être utilisés (Sachse *et al.*, 2008).

L'isolement de *Chlamydophila abortus* se fait sur œufs embryonnés ou sur culture cellulaire. Les embryons inoculés meurent entre le 4^{ème} et le 13^{ème} jour. La mise en évidence du germe se fait après coloration (OIE, 2008). Les cellules McCoy, BGM (Buffalogreen monkey) ou BHK (Baby hamster kidney) sont les plus couramment utilisées pour la culture cellulaire. La coloration des cellules de la culture par les méthodes de Giemsa ou de Gimenez après une incubation de 3 jours à la recherche de vacuole contenant *Chlamydophila abortus* (OIE, 2008).

Les frottis préparés à partir de calques d'organes (placenta) ou de coupes tissulaires peuvent être colorés en utilisant l'une des colorations usuelles. La coloration de Machiavello modifiée, de Gimenez, modifiée, de Giemsa ou de Ziehl modifiées sont les techniques de coloration les plus utilisées pour mettre en évidence *Chlamydia spp* (Dagnall et Wilshire, 1990).

Colorés avec la technique de Ziehl-Nelson, les corps élémentaires se présentent en petits corps coccoides en rouge ou rose sur un fond bleu ou vert. L'inconvénient de cette méthode est le manque de spécificité du fait de la grande ressemblance entre *Chlamydophila abortus* et *Coxiella burnetii* (Sachse *et al.*, 2008).

L'**Immunodétection** est une technique rapide et sensible consiste en l'utilisation sur coupes de tissus d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface de *Chlamydophila abortus* (LPS ou MOMP) et d'antisérum couplé à la fluorescéine (Zahn *et al.*, 1995 ; Hoelzle *et al.*, 2004 ; Borel *et al.*, 2006).

La Polymérase Chain Réaction (PCR) a connu ces derniers temps le développement de différentes variantes visant à assurer la détection quantitative du germe ainsi que la recherche de plusieurs agents infectieux dans le même échantillon (Berri *et al.*, 2009). Il s'agit d'une technique très sensible et spécifique mais avec un coût élevé, réservé en général pour le domaine de la recherche. La recherche de *Chlamydophila abortus* se fait dans tout type de prélèvements que soit liquides (secrétions de l'animal vivant) ou bien fragment d'organes après mort de l'animal (Borel *et al.*, 2006).

Le diagnostic indirect repose sur la recherche d'anticorps anti-*Chlamydophila abortus* dans le sérum et le lait. La détection d'anticorps a des fins multiples en médecine vétérinaire, elle constitue un outil précieux de diagnostic beaucoup plus simple pour sa réalisation et moins onéreux que les autres (isolement, PCR) et sert au dépistage de la maladie et à la détermination du statut immunitaire des animaux après vaccination (Sachse *et al.*, 2008).

Le test de fixation du complément est une technique adoptée par l'OIE pour le diagnostic et le dépistage de la chlamydia abortive. Son avantage est bien sa simplicité, cependant, elle a l'inconvénient d'avoir une spécificité limitée du fait des réactions croisées avec *Chlamydia pecorum* et même avec les autres bactéries gram négatif (Trávníček *et al.*, 2002 ; Sachse *et al.*, 2008).

La technique ELISA indirecte constitue le test immunoenzymatique le plus utilisé en diagnostic dans la médecine vétérinaire et même humaine du fait de sa simplicité et de sa sensibilité et de son coût réduit par rapport à la PCR (Trávníček *et al.*, 2002). Le test ELISA indirect commercialisé repose sur la mise en évidence d'anticorps anti-LPS de *Chlamydia abortus* (Sachse *et al.*, 2008).

Leptospira

Tout un panel de méthodes a été développé au fil des ans pour tenter d'améliorer le diagnostic de la leptospirose. Classiquement, on distingue les méthodes de détection de la bactérie, de ses antigènes ou de son matériel génétique et de celles de révélation des anticorps.

L'Examen direct est un diagnostic par mise en évidence de la bactérie. Elle se fait par visualisation de la bactérie permettant une identification directe ou par des techniques de détection d'ADN spécifique.

Différents échantillons peuvent être prélevés pour observer des leptospires ; des fluides de l'organisme (sang, urines, lait, liquide cébrospinal, péritonéal ou thoracique) ou des organes internes (rein, foie, poumon, les avortons, cerveau, appareil génital etc.) (OIE, 2009). Mais leur séquence suit toujours une chronologie précise.

Le sang, est l'échantillon le plus approprié, il contient des leptospires durant la phase de bactériémie, qui pourront être mis en culture durant les dix premiers jours après le début des symptômes. Au moins 1 ml de sang veineux doit être collecté de manière aseptique sur tube hépariné pour la culture (tube sec pour une sérologie, tube EDTA pour la PCR, le tube citraté est à proscrire car le milieu citraté va entraîner une acidification du milieu néfaste aux leptospires (Perolat et Baranton, 2000).

L'observation directe des leptospires est possible sur un prélèvement qui vient d'être réalisé ce qui est rarement le cas en pratique courante. Cette observation est réalisée au moyen d'un microscope à fond noir. L'observation se fera entre lame et lamelle avec un grossissement de 250 (Dikken, 1981). L'observateur étudie la morphologie caractéristique des Leptospires en

filament incurvé ainsi que leur mobilité particulière qui s'effectue par rotation, flexion et translation.

Pour réaliser cet examen, le sang doit subir une double centrifugation : une première centrifugation de 1000 tours par minute pendant 10 minutes puis une deuxième centrifugation à 4000 tours par minute pendant 20 minutes va permettre d'éliminer les cellules dans un premier temps puis de concentrer les Leptospires ensuite (Perolat et Baranton, 2000). Les urines ou le liquide céphalo-rachidien peuvent être également centrifugés. Le liquide prélevé pour observation doit être le plus proche possible du culot de centrifugation qui est la zone de concentration des leptospires (O'keefej, 2002).

Cette technique présente cependant de nombreuses difficultés : elle nécessite un prélèvement très frais, son seuil de détection est élevé (10^4 bactéries par ml) ce qui diminue sa sensibilité. Ensuite, la spécificité de ces tests est mauvaise ; en effet, des filaments de fibrine ou des débris cellulaires peuvent être source d'erreur et entraîner l'apparition de faux positifs (Dikken, 1981). Ce qui requiert un opérateur expérimenté. De plus, elle ne permet pas de différencier les leptospires pathogènes des Leptospires saprophytes. Ainsi, la différenciation entre *Leptospira*, *Leptonema* et *Turneria* par exemple ne serait pas possible par microscopie (Kososey-vrain, 2004).

Pour l'ensemble de ces raisons, cet examen est plus à considérer comme un examen d'orientation et doit toujours être confirmé par une culture bactériologique (Johnson, 1976). Il est rarement pratiqué sur le terrain.

La mise en culture est une technique qui permet d'établir un diagnostic de certitude. Le prélèvement une fois effectué doit être mis en culture le plus rapidement possible. La culture est délicate et très longue (environ 13 semaines) (Levett, 2001) et se réalise sur le sang, les urines et le liquide céphalo-rachidien. Elle se fait dans des milieux spécifiques pour leptospires : le milieu Ellinghaussen et McCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH). Ce dernier nécessite une préparation assez complexe et va pouvoir se conserver pendant une durée de 3 à 6 mois à 4°C. Avant ensemencement, le sang ou les urines sont dilués dix fois afin de diminuer le rôle d'éventuels inhibiteurs (Perolat et Baranton, 2000). Afin de limiter les contaminants, certains laboratoires réalisent systématiquement une filtration des prélèvements. Elle est réalisée avec des membranes de porosité 0,45 µm ou de 0,22 µm. Le milieu de culture peut être rendu sélectif par l'addition de 5 fluoro-uracile à raison de 100 µg/ml, ou de fosfomycine à 400 µg/ml ou de néomycine à 300 µg/ml (O'keefej, 2002).

Une fois les milieux ensemencés, ils sont placés en étuve à 30°C, à l'obscurité et en maintenant une agitation régulière pour faciliter leur croissance. Les cultures sont observées au microscope à fond noir les jours 1, 2, 3 post incubation puis une fois par semaine pendant 5 semaines minimum. On ne peut conclure à la négativité de la culture qu'au bout de deux mois au minimum (Kossey-vrain, 2004). Ce temps très long est en relation avec le temps de doublement considérable des leptospires qui est de près de vingt heures.

Enfin, même révélation à la culture donne un diagnostic de certitude qui permet d'identifier la souche infectante, celui-ci est tardif et très coûteux. C'est pourquoi en pratique cet examen est très peu utilisé.

L'inoculation aux animaux de laboratoire (cobaye ou hamster) peut être envisagée. Cependant, tous les serovars ne provoquent pas des signes cliniques évidents et la sensibilité des animaux varie selon les individus.

L'observation des Leptospires au microscope à fond noir ou la mise en culture peut être difficile lorsque le prélèvement est trop contaminé ou que les Leptospires sont présents en faible quantité. L'inoculation à l'animal d'expérimentation est très sensible, il favorise la multiplication des Leptospires et facilite leur l'identification. Ainsi, le passage sur l'animal sensible est indispensable pour conserver le pouvoir pathogène (Perolat et Baranton, 2000).

Le cobaye et le hamster de moins de 150 g (2 à 3 semaines d'âge) sont les animaux de choix. Cependant, la souris, le chinchilla, le chien, la gerbille et le poussin peuvent être utilisés pour cette manipulation (Dikken, 1981). En effet, les signes cliniques et les lésions induits chez ces animaux infectés par des leptospires sont similaires à ceux d'animaux infectés naturellement. Ces animaux de laboratoire doivent provenir d'élevages clos où il n'existe pas de leptospirose. Pour chaque échantillon, plusieurs animaux sont utilisés et inoculés à raison de 0.5 à 1 ml par voie intrapéritonéale de liquide pathologique (lait, sang, urine) (Mathon, 1979). La maladie débutant 3 à 10 jours après l'inoculation et les signes cliniques sont évidents à partir du 5^{ème} jour : ictère, prostration, amaigrissement. L'observation des animaux se fait tous les jours et tous les symptômes sont relevés quand ils existent. Pour déterminer s'il se produit une phase de leptospiémie, un examen au microscope à fond noir du liquide péritonéal est réalisé régulièrement pendant la phase présumée de la maladie. Les échantillons de liquide péritonéal sont prélevés dans le quadrant inférieur de l'abdomen à l'aide d'une fine pipette capillaire. Si un échantillon se révèle positif en microscopie à fond noir, du sang est prélevé et mis en culture. Si un animal meurt, l'autopsie est pratiquée, le foie et les reins sont mis en culture.

Ce moyen de diagnostic présente de nombreuses limites. En effet, les leptospires perdent rapidement leur virulence *in vitro*. Ainsi, tous les sérovars ne vont pas présenter de signes cliniques évidents sur les animaux inoculés. De plus la sensibilité des animaux est variable d'un animal à un autre. En conséquence, c'est pour ces différentes raisons que ce moyen diagnostic est peu utilisé.

L'Immunohistochimie peut aussi être utilisée. Les techniques de coloration par imprégnation argentiques sont d'un intérêt limité. On leur préfère la coloration à l'immunoperoxydase. Une fois le prélèvement fixé, on y ajoute des immunoglobulines dirigées contre le type de leptospire étudié puis la préparation est mise en contact successivement avec un antisérum de lapin conjugué à une peroxydase et avec un substrat de l'enzyme. Ce substrat, après action de l'enzyme, produit un précipité marron. Les leptospires prennent une coloration brun rougeâtre reconnaissable visualisée au microscope simple. L'avantage de cette technique réside dans l'association de la spécificité sérologique et la reconnaissance morphologique. Ainsi, elle permet de différencier des Leptospires des artefacts tels que les résidus de fibrine à condition que leur intégrité antigénique soit conservée (Drugeot, 1988).

En revanche, cette méthode présente l'inconvénient de ne donner aucune indication quant à l'identité du serovar infectant. On l'utilise plutôt pour déterminer la présence du genre *Leptospira*.

L'immunofluorescence est une technique d'immunohistochimie particulière. Cette technique met en jeu des réactions immunologiques révélées par des réactifs colorés. Elles nécessitent l'utilisation d'antisérums spécifiques et qui sont généralement réservés à des laboratoires spécialisés. L'observation de la morphologie des leptospires s'effectue au microscope à fluorescence et l'interprétation est difficile et va nécessiter une technique de laboratoire qualifiée (Bolin, 1996). Elle a l'avantage d'être rapide, facile et sa sensibilité pour la détection du serovar *hardjo* dans l'urine de bovin est inférieure à la sensibilité des méthodes moléculaires, mais comparable, voire supérieure à celle de la culture (Bolin *et al.*, 1989).

En raison des difficultés du diagnostic bactériologique classique, des techniques d'amplification génique par Polymerase Chain Reaction (PCR) ont été proposées. Ce sont des tests récents, basés sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), une méthode d'amplification du génome de l'agent pathogène. Ce sont les données apportées par le séquençage des génomes des Leptospires qui ont permis le développement du diagnostic par

PCR. Ainsi, dans un échantillon donné, des fragments génomiques spécifiques de leptospires peuvent être mis en évidence (André-Fontaine, 2002).

En pratique, des amorces ont été utilisées (courtes séquences de nucléotides spécifiques au genre *Leptospira* ou même spécifiques de certains sérovars, visant en général les gènes codant l'ARNr 16s ou 23s, les gènes lipL32, fib1, secY, gyrB et rrs (DJELOUADJI *et al.*, 2012) en présence de nucléotides et d'une enzyme active à haute température (l'ADN polymérase). Après des cycles alternant hautes et basses températures, on obtient un grand nombre de séquences d'ADN leptospirosique.

Plusieurs protocoles de PCR destinés à détecter l'ADN des Leptospires ont été développés depuis les années 1990. La différence entre ces protocoles réside dans le choix des amorces utilisées. Par exemple, la technique de Merien et collaborateurs, en 1992, est basée sur l'amplification d'une séquence de 331 paires de bases du gène rrs spécifique du genre *Leptospira*. Cette PCR mise au point permettait d'affirmer ou d'infirmer la présence de leptospires, mais elle ne permet pas de différencier les souches pathogènes des souches saprophytes dans des prélèvements cliniques. Ensuite, d'autres techniques ont été proposées afin de pouvoir distinguer les souches pathogènes des souches saprophytes. Elles sont basées sur une amplification d'une séquence du gène rrs mais avec deux jeux d'amorces différents ; l'un spécifique des souches pathogènes et l'autre spécifique des souches saprophytes (Murgia *et al.*, 1997). Dès lors, cette technique s'avère très utile en diagnostic dans la mesure où le praticien à défaut de connaître le serovar se voit confirmer par le laboratoire la présence de Leptospires pathogènes (Desbrosse et Pronosts, 2006).

La PCR se fait généralement sur sang ou urines, mais cela peut éventuellement se faire sur le liquide cébrospinal, l'humeur aqueuse, le lait ou sur la semence de taureau (Levett, 2001). Dans le sang, il faudra éviter d'utiliser des milieux héparinés car ils vont risquer de diminuer la sensibilité de la PCR (Bharti *et al.*, 2003). Pour les urines, une préparation des échantillons avant la PCR par un procédé magnétique particulier, semble être prometteur. Celui-ci utilise des billes magnétiques recouvertes d'anticorps antiLeptospires permettant d'augmenter la détection des Leptospires dans les urines (OIE, 2009).

La PCR est une méthode rapide, permettant un diagnostic précoce (avant la séroconversion). De plus, c'est un outil diagnostique relativement sensible et spécifique. La limite de détection des Leptospires par PCR est d'environ 10^3 bactéries/ml (Van *et al.*, 1989 ; Djelouadji *et al.*, 2012). Ainsi, Heinemann et collaborateurs, 1999, ont réalisé une comparaison entre des PCR,

des cultures réalisées sur semence et des sérologies, il a permis de mettre en évidence la plus grande sensibilité de la PCR par rapport aux cultures et aux sérologies. En effet, quand 80% des échantillons de sperme sont positifs à la PCR, seulement 25% à 45% des sérologies le sont et les cultures restent négatives. D'autres études menées sur le sérovar *hardjo* ont montré une sensibilité plus élevée de la PCR par rapport aux méthodes d'immunofluorescence ou la culture (Masri, 1997).

Il faut également noter qu'une PCR positive chez un animal ayant déjà commencé un traitement antibiotique, peut signifier la présence de *Leptospires* dans l'organisme, mais sous une forme non viable, les leptospires étant tués mais pas encore totalement éliminés (Sykes *et al.*, 2011).

Compte tenu de la difficulté de la mise en évidence bactériologique des leptospires, le diagnostic des leptospiroses est assuré essentiellement par sérologie. Cette dernière ne permet pas une mise en évidence directe des leptospires, mais elle révèle la présence d'anticorps anti-leptospires. Ce diagnostic sérologique n'est possible qu'environ 10 jours après l'apparition des symptômes. Il faut préciser qu'un traitement antibiotique retarde l'apparition des anticorps et peut même fausser les résultats sérologiques. Deux prélèvements espacés de 8 à 10 jours sont nécessaires à l'établissement du diagnostic de certitude des formes aiguës.

Les IgM apparaissent en moins d'une semaine puis les IgG apparaissent. Les IgM disparaissent rapidement alors que les IgG persistent pendant des mois, voire des années.

Les différentes techniques de diagnostic indirect comportent le test de microagglutination microscopique, l'ELISA directe et indirecte ainsi que la réaction de fixation du complément.

Le test de microagglutination microscopique (MAT = Microscopic Agglutination Test) :

Est le « gold standard », il est le plus utilisé pour le diagnostic de la leptospirose et est considéré par beaucoup comme le test de référence. Cette méthode, anciennement désignée sous le terme de réaction d'agglutination-lyse de Martin et Pettit mise au point en 1918, consiste à mettre en présence le sérum suspect à une dilution donnée avec des souches vivantes de leptospires de différents serovars cultivées expérimentalement. La présence d'anticorps agglutinants (seuls détectés par ce test) se traduit par l'agglutination des leptospires observée par microscope à fond noir (Rautureau, 2003). La batterie d'antigènes est composée de souches représentatives des sérogroupes dominants afin de pouvoir se rapprocher au maximum du sérovar recherché (Perolat et Baranton, 2000).

Un sérum est positif, à une dilution donnée, pour la souche testée, si au moins 50% des *Leptospires* sont agglutinées par rapport à une souche témoin qui fixe le seuil de positivité (c'est-à-dire l'inverse de la dernière dilution pour laquelle est observée la réponse positive) (Sykes *et al.*, 2011). Cette valeur reste assez subjective car elle est estimée visuellement. Chez les bovins, ce seuil est fixé à 1/100, mais pour les autres animaux, les seuils varient en fonction du contexte épidémiologique. En effet, une multiplication par quatre du taux d'anticorps est considérée comme significative d'une infection en cours.

Il existe une autre méthode qui consiste à réaliser des dilutions successives du sérum en micro plaques, type ELISA, et à lire directement l'agglutination dans les cupules où a lieu l'agglutination. Des études ont tenté de comparer le MAT traditionnel et celui en lecture directe. Ces études comparatives n'ont pas pu mettre en évidence une sensibilité ou une spécificité absolue pour chaque méthode (André-Fontaine *et al.*, 1988a).

Il est possible de rencontrer des réactions croisées entre serovars. En effet, les anticorps agglutinants produits par un animal en réponse à l'infection par un serovar réagissent souvent avec d'autres serovars. Par conséquent, le sérum d'un animal infecté par un serovar unique peut entraîner l'agglutination de plusieurs serovars (Bolin, 1996). Les réactions croisées vont diminuer avec le temps écoulé depuis l'infection, ainsi seul un sérum tardif va permettre d'identifier certainement une souche (Koslosky-vrain, 2004). Aussi, lors de coagglutination, on considère généralement que le serovar infectant est celui pour lequel on observe le titre en anticorps le plus élevé dans le sérum du patient. Les titres les plus faibles sont alors attribués aux réactions croisées.

Dans les cas de troubles chroniques, il va être souhaitable de privilégier le diagnostic de troupeau. En effet, le diagnostic individuel est très difficile et notamment dans les cas d'avortements (André-Fontaine *et al.*, 1988a). Pour confirmer une suspicion lors d'avortements, il faudra ainsi tester au moins 10 animaux et au mieux 10% du cheptel (Ellis, 1994).

Cependant, la technique de microagglutination a plusieurs avantages, donc c'est une méthode qualitative (elle permet de connaître contre quel sérotype les anticorps sont dirigés) et quantitative (le titre sérologique informe sur l'existence d'un contact avec les antigènes des *Leptospires*, et s'il s'agit d'une infection récente, en cours, ou résultante d'une vaccination). Il est important de connaître l'historique vaccinal de l'animal, car il pourra présenter des anticorps

dirigés contre les serovars vaccinaux, sans pour autant avoir été infecté. Souvent les titres issus de la vaccination auront une valeur inférieure à ceux d'une infection naturelle.

Pourtant le MAT est une méthode sensible, spécifique et quantitative, elle présente tout de même des inconvénients. En effet, cette technique est de réalisation difficile : il faut manipuler et entretenir les souches de leptospires au laboratoire. Son interprétation délicate est réservée aux laboratoires spécialisés. Or, la culture hebdomadaire répétée de souches représente un danger pour le personnel de laboratoire. Un autre désavantage de cette technique consiste en un risque permanent de contamination croisée des cultures d'antigènes, nécessitant la vérification périodique de chaque serovar (Levett, 2001). Ainsi, le MAT ne permet pas de distinguer si les anticorps agglutinants sont de type IgM ou IgG.

En dépit de ces inconvénients, le MAT reste la méthode la plus appropriée dans le cadre d'études épidémiologiques de séroprévalences, puisqu'elle peut être appliquée à n'importe quelle espèce animale. De plus, le panel d'antigènes peut être modifié à volonté (Levett, 2001).

Du fait de la complexité de mise en œuvre du MAT, d'autres tests sérologiques rapides utilisables lors d'infection aiguë ont été développés.

La méthode ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay) permet, à partir de préparations d'antigènes (extraits de la souche *L. biflexa* serovar patoc) par un traitement au formaldéhyde et chauffage (Perolat et Baranton, 2000) mis en présence du sérum à tester, de mesurer les taux d'anticorps IgG et IgM produits contre les leptospires. Cette méthode fait intervenir une enzyme qui engendre une réaction colorimétrique en cas de positivité de l'échantillon. La lecture du résultat se fait alors au moyen d'un lecteur de plaque Elisa ou bien un spectrophotomètre (Drugeot, 1988).

Les anticorps IgM étant décelables dès la première semaine de maladie, il devient possible de confirmer rapidement le diagnostic de leptospirose et, par là même, d'initier un traitement antibiotique approprié au moment où il est susceptible d'avoir le plus d'efficacité (Levett, 2004).

Les IgG ne sont détectables qu'à partir de deux à trois semaines après l'infection mais persistent plusieurs mois (titre maximal un mois après l'infection). En effet, la lipoprotéine recombinante rLipL32 constitue un antigène utilisable dans la détection d'IgG par ELISA chez les bovins. Une étude récente réalisée sur sérums de bovins a en effet montré que l'antigène LipL32 avait une sensibilité aussi bonne que la détection par agglutination microscopique (MAT) (Quaresma

Bomfim *et al.*, 2005). La sensibilité de rLipL32 s'est avérée légèrement moins bonne que celle du MAT dans des études de diagnostic de leptospiroses humaines et canines (97% de sensibilité et de spécificité par rapport au MAT pour la leptospirose canine). De nombreux tests basés sur la détection d'IgG par ELISA sont aujourd'hui disponibles en médecine vétérinaire. Ces tests sont bien souvent spécifiques de sérovars : *hardjo* et *pomona* pour les bovins et *hardjo* pour les moutons par exemple (Levett, 2001). Pour le sérovar *Grippotyphosa*, la comparaison des tests ELISA et MAT a révélé une sensibilité inférieure de l'ELISA et une spécificité équivalente (Perolat *et al.*, 1981).

L'intérêt spécifique de cette méthode est de permettre de différencier un animal récemment infecté (taux d'IgM prépondérant), d'un animal vacciné ou ayant été en contact avec l'agent infectieux plus de trois mois auparavant (taux d'IgG élevé) (Langston et Heuter, 2003 ; Bolin, 1996).

L'ELISA présente une meilleure sensibilité au MAT, il est de plus spécifique, simple, facile à réaliser, rapide de détection des anticorps et objectif. Il reste encore à mettre au point des tests ELISA spécifiques d'un antigène donné. Sous sa forme actuelle, l'ELISA est considéré comme un test de dépistage mais ne permet pas de mettre en évidence la souche de *Leptospire*s responsable de la maladie.

En pratique vétérinaire, la technique par fixation du complément peut être également utilisée, mais cela est moins standardisé (Levett, 2001).

D'autres méthodes sont utilisées dans le diagnostic des *Leptospire*s parmi ceux :

la réaction de fixation du complément est une méthode qui a surtout été utilisée en médecine humaine (Nicolescu, 1981). Elle est beaucoup moins sensible que le test de microagglutination. En général, l'antigène utilisé provient de la *L. biflexa* patoc merthiolaté. Cette méthode n'est utilisable que pendant une brève période chez les bovins, car les anticorps intervenant dans la réaction disparaissent après dix jours (Nicolescu, 1981).

Le test de macro-agglutination sur lame utilise un antigène thermorésistant préparé à partir d'une souche de *L. biflexa* patoc. Ce test est facilement mis en œuvre, très simple mais sa mauvaise sensibilité et surtout sa mauvaise spécificité le rend inadapté pour le diagnostic (Peillier, 1989). En revanche, le test d'agglutination macroscopique ne détecte que les IgG alors que l'ELISA ou le MAT détecte les IgG mais aussi les IgM (Drugeot, 1988).

Le LAT ou latex agglutination test est une méthode simple, économique et a une rapidité d'action spectaculaire en donnant les résultats dans un délai de deux à dix minutes, mais elle apparue moins sensibles que le test d'ELISA. En effet, dans une étude sur une population de 65 animaux testés de manière indifférenciée (bovins et chiens), 63,1% sont testés positivement avec LAT et 69,2% le sont avec l'ELISA (Legrand, 2007).

En conclusion, on retiendra sur les différentes techniques de diagnostic qu'il n'y a pas une seule technique qui peut être recommandée pour toutes les situations cliniques mais plusieurs. En effet, la technique de microscopie sur fond noir est déconseillée car son manque de sensibilité et de spécificité la rend peu fiable. La culture bactérienne est également déconseillée dans un but diagnostique car elle est longue et difficile à réaliser. Les techniques immunohistochimiques et d'immunofluorescence directe peuvent être intéressantes mais manquent de sensibilité et sont peu disponibles en routine. Les progrès de la biologie moléculaire présentent un intérêt évident. Le développement de la PCR permet un diagnostic précoce avec une forte sensibilité. Cette méthode est de plus en plus utilisée. La sérologie est la méthode de confirmation. Cependant, le test de référence reste encore aujourd'hui le MAT, sa complexité de réalisation a poussé à développer d'autres épreuves sérologiques, c'est le cas de l'ELISA par exemple.

Listeria

Le diagnostic est basé avant tout sur le diagnostic direct, par isolement de *Listeria monocytogenes* dans les prélèvements. L'examen bactériologique comporte un examen direct et un ensemencement, une identification et un antibiogramme.

L'examen microscopique direct montre des petits bacilles à Gram positif, réguliers, associés en palissade et diplobacilles et quelquefois en courtes chaînes. Ils doivent être différenciés des *Lactobacillus*, des bactéries corynéformes et quelquefois de certains Streptocoques.

Dans le LCR., les *Listeria monocytogenes* peuvent se trouver en position intra-cellulaire dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles et sont souvent en faible quantité.

La PCR et la culture sur milieu enrichi sont les techniques les plus sensibles, cependant elles ne doivent être interprétées que lors de prélèvements réalisés aseptiquement.

L'examen bactériologique peut être fait sur des prélèvements d'encéphales, de placentas ou de l'avortons (caillette) mais aussi sur des écoulements vaginaux.

L'ensemencement, en pratique courante, l'isolement de *Listeria monocytogenes* est réalisé sur gélose au sang (à 5% de cheval ou mouton) à 37°C, en atmosphère aérobie, afin d'obtenir une croissance optimale et d'observer une zone hémolyse de type bêta, (hémolyse complète des hématies), souvent étroite. Les colonies sont circulaires, lisses, translucides, de 1 à 1.5 mm de diamètre après 24h d'incubation à 37°C.

La gélose au sang + acide nalidixique (Négram) permet d'isoler plus facilement la bactérie à partir de prélèvements plurimicrobiens, l'acide nalidixique inhibant un certain nombre de bacilles à Gram négatif.

L'identification des bactéries : la morphologie au Gram, l'aspect des colonies sur gélose au sang, la croissance en aérobie et anaérobie, la présence d'une catalase et l'absence d'oxydase permettent une orientation vers le genre *Listeria* et conduisent à la réalisation d'une galerie d'identification de type Api *Listeria* bioMérieux. La caractérisation plus fine des souches est effectuée par le CNR *Listeria* afin de comparer les souches isolées des infections humaines entre-elles et éventuellement, en cas de cas groupés, de les comparer aux souches isolées de produits alimentaires.

L'antibiogramme : *Listeria monocytogenes* est sensible habituellement aux aminopénicillines (amoxicilline), aux aminosides (comme gentamicine, nétilmicine, amikacine), aux macrolides, aux tétracyclines, aux sulfamides, au triméthoprim, à la rifampicine, à la vancomycine.

Cette bactérie présente une résistance naturelle à l'acide nalidixique et à la colistine. Les céphalosporines dont celles de troisième génération ainsi que les fluoroquinolones et la fosfomycine sont inefficaces dans le traitement des listérioses. Des résistances acquises ont été décrites pour les tétracyclines, l'érythromycine, le triméthoprim, la rifampicine, la kanamycine.

Identification moléculaire : la recherche de *Listeria monocytogenes* peut être réalisée par identification de gènes cibles (gène codant pour la listériolysine) par amplification génique (PCR).

L'immunohistochimie sur encéphale de ruminants pour la recherche d'antigènes de *Listeria* est la méthode de choix lors d'encéphalite.

Campylobacter

Les *Campylobacter* seront recherchés très logiquement en majorité dans les selles et lors d'hémoculture. Les laboratoires de bactériologie devraient les rechercher systématiquement lors de coproculture.

Isolement et identification de l'agent pathogène : prélèvement des échantillons, chez le mâle : sécrétions ou mucus du prépuce et semence et chez la femelle : mucus vaginal et cervico-vaginal, le placenta. Chez l'avorton, le contenu stomacal, les poumons et le foie du fœtus fournissent les meilleurs prélèvements pour l'isolement de l'agent causal. Les prélèvements sont inoculés directement sur des milieux d'enrichissement et de transport, ou dans du PBS $\pm$ 1 % de formol pour l'épreuve d'immunofluorescence.

De nombreux milieux de culture couramment utilisés pour l'isolement bactériologique de la campylobactériose génitale bovine. Il convient de remarquer que plusieurs milieux utilisés pour l'isolement de *Campylobacter spp.* ne conviennent pas pour l'isolement de *C. fetus* du fait des produits anti-microbiens (par ex. les céphalosporines) qui pourraient inhiber sa croissance (Van Bergen *et al.*, 2005). La plupart des milieux contiennent de la cycloheximide. En raison de sa toxicité potentielle, cet agent anti-fongique peut être remplacé par de l'amphotricine B. Le milieu sélectif recommandé pour l'isolement de *C. fetus* est le milieu de Skirrow. La base de ce milieu est un milieu au sang (avec 5 ± 7 % de sang défibriné et contient des agents sélectifs : sulfate de polymyxine B (2,5 UI /ml), du triméthoprim (5 μ g/ml), de la vancomycine (10 μ g/ml) et de la cycloheximide (50 μ g/ml).

La morphologie au microscope de *Campylobacter* est une bactérie mobile mais cette propriété peut disparaître lors de passages en cultures. *Campylobacter* prend souvent la forme d'un fin bacille incurvé de $0,3 \pm 0,4$ μ m de large et de $0,5 \pm 8$ μ m de long. Des formes courtes (en forme de virgule), moyennes (en forme de S) et longues (hélice $\pm$ plusieurs spirales) peuvent être observées simultanément à l'État frais. Les bactéries sont systématiquement séparées les unes des autres. Les cultures anciennes peuvent contenir des bactéries de type coccus.

La technique d'immunofluorescence peut être utilisée pour l'identification immunologique de *Campylobacter fetus*. Elle peut identifier directement la bactérie ou confirmer l'identification d'une souche après isolement. Elle ne permet pas de différencier les différentes sous-espèces.

L'identification biochimique des sous-espèces de *Campylobacter fetus* peut être utilisée.

Plusieurs méthodes moléculaires pour l'identification des sous-espèces de *C. fetus* ont été décrites, notamment le séquençage du gène 16S (Gorkiewicz *et al.*, 2003), la PFGE (On et Harrington, 2001), l'AFLP (Wagenaar *et al.*, 2001), et la MLST (Van Bergen *et al.*, 2005). Cependant, la plupart de ces méthodes sont longues à mettre en œuvre, nécessitent du matériel coûteux et de l'expérience. Les laboratoires de diagnostic pourront utiliser plus facilement la PCR. Plusieurs méthodes de PCR sont réputées spécifiques de la sous-espèce en particulier celles mises au point par Hum *et al.* (1997), Wang *et al.* (2002) et, plus récemment, par Tu *et al.* (2005) et Van Bergen *et al.* (2005).

La technique de PCR multiplex décrite par Hum *et al.* (1997) est la plus couramment citée. Elle permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique de *C. fetus* (plus petit d'environ 200 pb que le fragment de 960 pb décrit dans la publication d'origine), ainsi qu'un fragment spécifique de *C. fetus subsp. venerealis*. Cette technique de PCR multiplex permet donc la différenciation des deux sous-espèces (un produit d'amplification pour *C. fetus* contre deux produits d'amplification pour *C. fetus subsp. venerealis*). Les souches de *Campylobacter fetus subsp. venerealis biovar intermedius* n'ont pas été incluses dans l'étude de validation de la PCR de Hum, mais des isolats identifiés comme appartenant au biovar *intermedius* par AFLP, sont classés grâce à la PCR de Hum soit comme *C. fetus subsp. fetus* soit comme *C. fetus subsp. venerealis* (Van Bergen *et al.*, 2005). La comparaison de la méthode PCR avec l'AFLP et la MLST (Van Bergen *et al.*, 2005) ou avec le test à la glycine (Willoughby *et al.*, 2005) confirme que la PCR peut donner de faux résultats positifs ou négatifs. La technique de PCR décrite par Wang *et al.* (2002) ne révèle qu'un produit spécifique de *C. fetus subsp. fetus*. Ces résultats n'ont été obtenus que sur un nombre très limité de souches. L'évaluation récente de ses performances sur un plus grand nombre d'échantillons a donné des résultats à la fois faux positifs et faux négatifs en ce qui concerne la différenciation des sous-espèces (Van Bergen *et al.*, 2005). Les techniques d'amplification au hasard de l'ADN polymorphique (RAPD pour random amplification of polymorphic DNA) décrites par Tu *et al.* (2005) ont été publiées récemment et n'ont été évaluées que sur un petit nombre de souches de *C. fetus subsp. venerealis*. Leurs performances devront être évaluées sur un plus grand nombre de souches.

La technique de PCR décrite récemment par Van Bergen *et al.* (2005) a montré une parfaite concordance avec l'AFLP pour l'identification de *C. fetus subsp. venerealis* et est donc considérée comme la meilleure méthode actuellement disponible pour la détection de *C. fetus subsp. venerealis*. Cependant, cette technique ne reconnaît pas les souches définies par l'AFLP comme étant *C. fetus subsp. venerealis biovar intermedius* (preuves sérologiques par détection

d'anticorps). Un test ELISA est disponible pour détecter les IgA sécrétoires spécifiques dans le mucus vaginal après avortement dû à *C. fetus subsp. venerealis*. Ces anticorps sont persistants et leur concentration reste constante plusieurs mois dans le mucus vaginal (Hum *et al.*, 1991). Le premier prélèvement doit être réalisé après la période d'involution (en général 1 semaine après l'avortement) quand le mucus vaginal devient clair. Un test ELISA pour la détection d'une réponse humorale sérique en IgG après vaccination a été décrit.

Le virus du BVDV

Le diagnostic clinique et épidémiologique reprend l'ensemble des éléments décrits dans la partie précédente. Ces éléments ne permettent pas d'établir un diagnostic de certitude. Cependant, l'observation de certains signes doit faire suspecter la maladie (baisse de fertilité, augmentation du taux de mortalité périnatale, augmentation du nombre d'avortements et de malformation congénitale). Cependant, dans un certain nombre de cas, l'infection d'un troupeau peut être asymptomatique (Grooms *et al.*, 2009).

La maladie des muqueuses provoque des lésions relativement caractéristiques, digestives et extra-digestives.

Pour les lésions digestives, elles sont observables et essentiellement de type ulcératif dans la partie antérieure du tube digestif : ulcérations superficielles « en coup d'ongle » au niveau de la bouche et du pharynx, ulcères linéaires allongés le long de l'œsophage et quelques rares ulcères sur les préestomacs. Dans la partie postérieure du tube digestif, ce sont plutôt des lésions inflammatoires avec une inflammation catarrhale plus des pétéchies au niveau de la caillette. En zone intestinale, une entérite iléo-cæco-colique et une rectite avec des micro-ulcères (Maillard, 2003).

Lésions extradigestives sont représentées essentiellement par des ulcères de la couronne et du talon de l'onglon, des espaces interdigités, une inflammation de l'œil et une dermatite exsudative dans les régions à peau fine (Maillard, 2003).

Les examens de laboratoire sont un recours indispensable dans le cas de l'infection par le BVDV.

1. Détection du virus : plusieurs méthodes de détection existent.

- **L'isolement viral en culture cellulaire** est généralement considéré comme la méthode de référence pour le diagnostic virologique. Il s'agit de la seule méthode permettant l'identification du biotype CP (Dubovi, 2013).

Cette technique consiste à mettre en culture un échantillon sur des cellules cibles. Si cet échantillon est contaminé par le virus, le virus se développera et la mise en évidence est effectuée grâce à des techniques immunologiques (immunofluorescence, immunoperoxydase) dans la mesure où la plupart des souches circulantes sont nCP (Borck, 1995).

Les cellules utilisées pour la mise en culture sont surtout des cellules rénales ou testiculaires de fœtus bovin, les lignées cellulaires de cornets nasaux de bovin et la lignée cellulaire MDBK.

Les échantillons à tester sur les animaux vivants peuvent être préférentiellement du sang total. Peut être également recherchée dans le sperme. Cependant, le sperme complet est fortement cytotoxique et doit donc être dilué dans le milieu de culture cellulaire, en général à 1/10 au moins (Dubovi, 1990 ; Radostits, 2007).

Les échantillons à tester sur les animaux morts peuvent être préférentiellement la rate, la thyroïde, les reins, l'encéphale, les nœuds lymphatiques et les intestins. Le délai de réponse de ce test est de 6 à 8 jours si c'est positif et le double si c'est négatif (Dubovi, 1990 ; Douart et Simon, 1997).

Cette méthode de mise en évidence du virus est encore considérée comme la méthode de référence, bien que peu utilisée. Elle apparaît moins sensible que la PCR et risque de fournir des résultats faussement positifs si le virus est inactivé par des anticorps colostraux lors de prélèvement chez le jeune de moins de quatre mois. Cette technique est adaptée à la recherche des IPI mais est déconseillée pour les animaux de moins de quatre mois car les anticorps colostraux peuvent empêcher l'isolement viral (Brock *et al.*, 1998 ; Zimmer *et al.*, 2004).

L'isolement viral est une méthode très fiable mais très lourde à mettre en place (Saliki et Dubovi, 2004), son principal avantage est ouvert et permet la détection sous certaines conditions d'autres virus que le BVDV (Dubovi, 2013).

- **La détection des antigènes viraux (ELISA ag) :** les tests ELISA sont couramment employés pour détecter rapidement les antigènes viraux. Avec le développement des anticorps

monoclonaux spécifiques des Pestivirus, l'ELISA de capture a été mis au point : les échantillons à tester sont déposés sur les puits d'une plaque de microtitrage tapissée d'un mélange d'anticorps monoclonaux. D'autres anticorps monoclonaux conjugués à la peroxydase assurent la capture de l'antigène viral en « sandwich » et servent d'anticorps révélateurs (Entrican *et al.*, 1994). Les antigènes recherchés sont principalement NS2-3, Erns ou E2. La quantité d'antigène viral est alors proportionnelle à la densité optique obtenue.

Les échantillons approuvés pour le test ELISAag sont le sérum, les biopsies de la peau (encoches d'oreille) et peut également être utilisé à partir de caillots, d'extraits leucocytaires ou encore de broyats d'organes lymphoïdes traités par un tampon lytique (Lindberg et Alenius, 1999). Les biopsies d'oreille (cartilage auriculaire) sont devenues un échantillon idéal pour détecter les animaux IPI par ELISAag pour un certain nombre de raisons. Tout d'abord, Les anticorps maternels n'interfèrent pas avec le test ELISA (Kuhne *et al.*, 2005), donc peuvent être testés avec confiance pour les très jeunes veaux. Des prélèvements de biopsie auriculaire peut être collectés plus rapidement que ceux du sang et réalisés parallèlement avec le bouclage des oreilles lors de l'identification systématique des bovins (Kuhne *et al.*, 2005).

La sensibilité de cette épreuve est très bonne et proche de celle de l'isolement viral pour les animaux IPI dont les titres viraux sont très élevés (Schelcher *et al.*, 1993). Alors que chez les bovins infectés transitoires (IT) dont les titres viraux étant plus faibles, la sensibilité est médiocre. L'ELISA est plus efficace que l'isolement viral mais reste peu fiable en période néonatale lors d'utilisation de sérum comme échantillon c'est-à-dire sur des animaux virémiques âgés de moins de quatre mois car les anticorps colostraux masquent la virémie (Simon *et al.*, 1994). Il s'agit donc d'une méthode d'exécution simple, rapide, peu coûteuse et pratique pour trier un grand nombre de prélèvements de sang (Houe, 2006).

- La détection des acides nucléiques (la PCR par transcriptase inverse en temps réel RT-PCR ou RT-qPCR) : la PCR est l'abréviation de l'expression anglaise Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne par polymérase. La technique consiste, après rétrotranscription de l'ARN viral en ADN complémentaire, à amplifier un fragment de génome présent dans un échantillon. Ensuite, les produits d'amplification sont révélés par des méthodes telles que l'électrophorèse ou avec la variante actuelle où les produits d'amplification sont révélés au cours même de la phase d'amplification : c'est la RT-PCR ou PCR en temps réel (Sandik, 2005 ; Dubovi, 2013).

Elle se fait à partir des leucocytes qui ont une charge virale importante, issus de prélèvement de sang total sur EDTA et pas d'héparine car elle inhibe la PCR ou dans le sérum prélevé sur tube sec, de lait ou à partir d'une biopsie de la rate, les intestins et l'oreille. La RT-qPCR est insensible aux substances toxiques et à la présence d'anticorps colostraux interférents chez un jeune bovin de moins de 6 mois (Zimmer *et al.*, 2004 ; Fux et Wolf, 2011) mais elle est très sensible à la contamination d'échantillons qui peut entraîner de faux positifs.

En raison de la grande variabilité des Pestivirus, les kits commerciaux ont été conçus pour détecter l'ensemble des souches connues de BVDV et BDV, souvent en utilisant deux à trois couples d'amorces différentes. Ces kits sont basés principalement sur l'amplification de la région 5'UTR, région très bien conservée chez tous les Pestivirus. L'existence de souches atypiques qui ne seraient pas détectées par la PCR reste toutefois envisageable (Le Dréan, 2010).

Étant donné que la charge virale chez les IPI est en règle générale beaucoup plus élevée que chez les bovins infectés transitoires (IT), la détection de ces animaux se fait avec une grande certitude aussi bien avec l'ELISA antigène qu'avec la RT-qPCR. Mais vu que l'ELISA antigène est moins sensible que la RT-qPCR, les animaux infectés transitoires ne seront bien souvent pas détectés par ce test contrairement au test RT-qPCR, qui est capable de détecter des charges virales relativement basses. Ce dernier permet de faire la différence entre un IPI et un bovin infecté transitoire (IT), car le premier est décelé plus tôt (la différence de charge virale de 2^{10}) (Zimmer *et al.*, 2004).

La meilleure sensibilité de la RT-qPCR permet, outre la détection des animaux IT, de tester des pools d'échantillons de sérum ou de sang de telle façon à comprimer le coût du dépistage, lié à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons individuels. Cette méthode est souvent utilisée en combinaison avec l'ELISA antigène, en analysant d'abord des pools d'échantillons de sérum ou de sang à l'aide de la RT-qPCR et en identifiant ensuite les animaux IPI à l'aide de tests ELISA antigène réalisés sur les échantillons individuels des pools positifs (Ganée, 2011).

- **L'immunofluorescence ou immunohistochimie** : l'identification rapide de l'antigène dans les échantillons de tissus peut être pratiquée par des méthodes immunohistochimies telles que l'immunofluorescence ou la mise en évidence immunoenzymatique (par l'immunoperoxydase) sur des coupes de tissus congelés (Broderson, 2004 ; Vanderley *et al.*, 2011). En raison du tropisme multiple du BVDV, tous les organes peuvent être prélevés. Cependant, la thyroïde et les glandes salivaires, les nœuds lymphatiques et le pourtour des lésions intestinales ainsi que

la rate semblent donner de meilleurs résultats. Chez l'animal vivant, les prélèvements peuvent être réalisés à partir des érosions nasales ou buccales pour pratiquer des biopsies, notamment la biopsie oculaire qui a été décrite comme une méthode efficace pour la détection des animaux IPI (Njaa *et al.*, 2000 ; Dubovi, 2013).

*** Immunofluorescence**

En ce qui concerne l'immunofluorescence, elle est plus adaptée sur des coupes de tissus necroscopiques congelés, cette méthode présente un intérêt direct dans le diagnostic post-mortem d'une infection par le BVDV (Brock, 1995 ; Vanderley *et al.*, 2011).

L'inconvénient de l'immunofluorescence est l'existence de faux positifs due à la fluorescence de fond provoquée par des réactions sérologiques non spécifiques, telle la fluorescence émise par les vaisseaux sanguins sains et l'existence de faux négatifs due à la grande variabilité antigénique du BVDV qui peut rendre l'antisérum inefficace si la souche inoculée pour sa production est différente de celle qui est recherchée d'où son manque de sensibilité. Cependant, récemment des anticorps monoclonaux ont été découverts agissant pratiquement avec toutes les souches de BVDV et limiter les faux négatifs. De même, le stockage prolongé du tissu dans le formol peut détruire la capacité des anticorps monoclonaux à reconnaître les épitopes cibles (Dubovi, 2013).

Les avantages de cette technique sont la rapidité et ne nécessitent pas de cultures cellulaires. Elle sera donc utilisée préférentiellement pour la recherche des bovins IPI ou souffrant de la maladie des muqueuses à tout âge et ne pas être affectée par la présence des anticorps du colostrum (Houe *et al.*, 2006). En revanche, son manque de sensibilité lui fera préférer l'isolement viral dans la recherche d'infections aiguës.

*** Le test immunoperoxydase**

Le test immunoperoxydase est assez proche de l'immunofluorescence. Il consiste à marquer par la peroxydase la liaison anticorps-antigène du BVDV. Il se fait sur des coupes d'organe congelées ou fixées à l'alcool et incluses dans de la paraffine. Il peut aussi être pratiqué sur des frottis de leucocytes. La sensibilité, la spécificité et la rapidité sont équivalentes à l'immunofluorescence. Son utilisation sera donc la même que pour l'immunofluorescence (Clarke, 1996 ; Broderon, 2004).

2. Détection des anticorps : actuellement, la mise en évidence des anticorps dirigés contre le BVDV est réalisée quasi exclusivement par des méthodes immunoenzymatiques. La séroneutralisation reste le test de référence mais son recours sur le terrain est obsolète. La fixation du complément, l'épreuve d'immunodiffusion en gélose et l'immunofluorescence sont des techniques qui ont été abandonnées car elles étaient moins sensibles.

Le dépistage sérologique permet de détecter la présence d'une circulation virale dans un cheptel par la mise en évidence d'animaux porteurs d'anticorps spécifiques. Il ne permet cependant pas de détecter directement d'éventuels individus IPI.

*** Le test de séroneutralisation** est une méthode quantitative qui permet de déterminer le titre du sérum en anticorps anti-BVDV. Le principe est de mettre en évidence les éventuels anticorps neutralisants présents dans le sérum. Pour cela, des quantités constantes de virus d'épreuve sont mises en contact avec des dilutions croissantes du sérum à tester puis inoculées à une culture cellulaire sur microplaques et incubées 3 à 5 jours. Le virus d'épreuve est le plus souvent une souche cytopathogène afin de détecter facilement la neutralisation du virus, si les cultures entraînent la destruction de ces cellules, cela signifie que le virus n'a pas été neutralisé et que le sérum à tester ne contient pas d'anticorps. Si au contraire, les cultures présentent le même aspect que les lots témoins, le virus a été neutralisé par les anticorps du sérum. Parfois les souches de virus d'épreuve utilisées sont des souches non cytopathogènes. La neutralisation virale est alors appréciée par la technique d'immunofluorescence (Saliki et Dubovi, 2004 ; Sandik, 2005).

La séroneutralisation permet de détecter principalement des anticorps neutralisants dirigés contre les protéines structurales E2, mais aussi Erns et E1 (Sandik, 2005 ; Le Dréan, 2009). Les antigènes structuraux E2 sont les antigènes immunodominants responsables de la réponse en anticorps neutralisants (Potgieter, 1995 ; Ridpath, 2012). La séroneutralisation permet donc de vérifier l'efficacité de protection immunitaire contre le BVDV. D'ailleurs, certains auteurs ont étudié l'efficacité de vaccins dirigés contre le BVDV par cette technique (Hamers *et al.*, 2002).

*** Tests Immunoenzymatiques**

a) ELISA indirect

Le sérum à tester est versé sur une microplaque tapissée d'antigènes (Erns ou NS3). S'il contient des anticorps, ceux-ci se fixent sur les antigènes. Après rinçage, les anticorps recherchés sont

révélés par des antiglobulines spécifiques d'espèces, conjuguées à une enzyme qui agit sur un substrat chromogène. On obtient un signal lumineux. La lecture se fait au spectrophotomètre ou la densité optique est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon. La méthode fournit une réponse qualitative, positive ou négative sans donner de valeur chiffrée (Goetghelucke, 2002).

b) ELISA compétition

L'ELISA de compétition consiste à mettre en compétition les anticorps de l'animal avec un anticorps monoclonal anti NS3 marqué à la peroxydase. Les échantillons sont mis au contact avec NS3 fixée dans des puits. Si des anticorps spécifiques sont présents dans le sérum à tester, ils se fixent sur la NS3 qui est alors masquée. Ensuite, l'addition des anticorps monoclonaux anti NS3 couplés à une enzyme. S'il y a des anticorps dans l'échantillon, il n'y aura pas de fixation possible. Donc il n'y aura pas de signal lumineux et l'échantillon est positif (Goetghelucke, 2002).

Les performances diagnostiques des tests ELISA anticorps dépendent de l'antigène viral utilisé dans le kit. Dans les tests actuellement disponibles, ils sont dirigés principalement contre la protéine NS2-3 (Sandvik ,2005 ; Le Dréan ,2010). Cette protéine immunodominante est bien conservée au sein des pestivirus mais n'induit pas la formation d'anticorps neutralisants (Potgieter ,1995 ; Ridpath ,2012). Les kits ELISA renseignent donc uniquement sur la présence ou l'absence de contact antérieure avec le BVDV, mais pas sur l'efficacité de la protection immunitaire contre le virus. Ainsi, les tests détectant les anticorps NS2-3 sont plus adaptés que les tests détectant les anticorps totaux pour le dépistage des bovins IPI. En effet, un bovin IPI en dehors de la période colostrale, surinfecté par une souche hétérologue développera des anticorps contre les déterminants antigéniques présents dans la souche de surinfection ou vaccinale et absente dans la souche dont il est porteur chronique. Ce bovin sera détecté séronégatif avec un test ELISA détectant spécifiquement les anticorps NS2-3 et pourra être séropositif avec un test ELISA anticorps « totaux » ou en séroneutralisation (Ridpath ,2012).

Les performances en termes de sensibilité et de spécificité ne peuvent être appréciées globalement, tant les résultats publiés apparaissent variables d'un test à l'autre. En général, ces études montrent une très bonne concordance avec le test de référence qui est la séroneutralisation (Beaudeau *et al.*, 2001). Il apparaît également que les ELISA de compétition présentent une spécificité analytique plus élevée que la technique non compétition.

Les kits de sérologie ELISA présentent plusieurs avantages, comparés à la séroneutralisation. Ils sont de mise en œuvre rapide, peu coûteux, fiables et permettent d'analyser un grand nombre d'échantillons. De plus, ils ne nécessitent pas de mise en culture cellulaire ou l'utilisation de souches de référence, évitant ainsi les problèmes mentionnés par la séroneutralisation (Dubovi, 2013). Son automatisation est possible, ce qui permet l'élimination des erreurs et les variations dépendantes de l'opérateur.

Interprétation des tests sérologiques

L'interprétation des tests sérologiques est résumée au sein du Tableau 4 Cette interprétation est générale à toutes les méthodes (Chase *et al.*, 2003).

Tableau 4 : interprétation des tests sérologiques (Chase *et al.*, 2003).

Sérologie négative	Sérologie positive
-Animal sain, jamais contaminé -Animal en cours de séroconversion -Animal IPI non recontaminé	-Animal immunocompétent ou contaminé -Animal vacciné par un vaccin vivant -Présence d'anticorps colostraux -IPI recontaminé par une souche différente de la souche d'origine.

Herpes virus bovin de type 1 (BHV1)

L'isolement viral sur cultures cellulaires reste la technique standard pour la détection du BHV1. Elle peut se faire sur tous types de prélèvement. Le virus doit nécessairement être vivant pour conserver son pouvoir infectieux, ce qui impose des conditions de prélèvements et d'envois stricts.

Il consiste à mettre en évidence l'effet cytopathogène du virus sur les cellules sensibles (en général des cellules primaires de testicules ou de reins de veaux). Cet effet induit par le BHV1 apparait habituellement trois à cinq jours après l'inoculation (Straub, 1990 ; Turin et Russe, 2003). Il est caractérisé par un arrondissement des cellules sous forme d'amas en grappes et la formation de trous dans le tapis cellulaire. Ce sont ces changements que l'on va observer au

microscope optique qui permettent d'orienter le diagnostic vers une famille virale. Le diagnostic définitif se fait ensuite par l'utilisation de tests immunologiques tels que la séroneutralisation et l'immunochimie (Straub, 1990 ; Turin et Russe, 2003). La sensibilité de cette technique est bonne mais nécessite un délai de 3 à 4 jours.

La microscopie électronique peut également être utilisée pour la détection de particules virales par ses caractéristiques structurelles et morphologiques. Cependant, la faible sensibilité, le coût élevé et la nécessité d'un personnel hautement qualifié pour l'exploitation et l'interprétation des résultats font que cette technique ne soit pas faisable comme outil de diagnostic (Nandi *et al.*, 2009).

La recherche des antigènes viraux fait appel à l'immunohistochimie et l'immunofluorescence. Elles s'effectuent sur coupe d'organe fraîche présentant des lésions ou congelée ainsi que sur des frottis cellulaires obtenus à partir des écouvillons nasaux. Les virions ne sont pas nécessairement vivants, ce qui permet des règles d'acheminement moins strictes que pour la recherche des virions. Le résultat est rapide (24h) mais la sensibilité est moyenne (Roehe *et al.*, 1997).

La recherche de l'ADN viral peut se faire à travers la PCR qui vise à amplifier une région cible de l'ADN viral. Elle présente les avantages potentiels de hauts niveaux de sensibilité et de spécificité, ainsi que la vitesse d'exécution. Plusieurs variantes de PCR ont été développées (nested PCR, multiplex PCR et real time PCR) pour la détection de BHV1 avec différentes régions cibles du génome virale (Esteves *et al.*, 2003 ; Claus *et al.*, 2005). Elle peut être appliquée sur tout type de prélèvement (le sang total, le sérum, le sperme, le liquide folliculaire...) et ne nécessite pas de virus vivants (Fuchs *et al.*, 1999 ; Claus *et al.*, 2005).

L'ADN viral est détectable dans le sang de l'individu non seulement pendant la phase aiguë mais aussi pendant la phase subclinique. De plus, la PCR permet une détection du virus avant la séroconversion et la production d'anticorps, voire chez les individus séronégatifs porteurs latents. En revanche, la technique de PCR requiert un laboratoire spécialisé, a un coût important et sensible aux contaminations, pouvant donner lieu à des faux positifs (Fuchs *et al.*, 1999).

Pour le diagnostic indirect, nous utilisons des méthodes sérologiques pour la recherche d'anticorps anti-BHV1 sur des échantillons de sérum et de lait (Muylkens *et al.*, 2007), le sérum contenant vingt fois plus d'anticorps que le lait. Ce dernier n'est pas utilisé pour effectuer un diagnostic individuel mais pour contrôler la prévalence de l'infection au niveau du troupeau.

Tandis que le sérum est utilisé pour des analyses individuelles et à l'échelle de troupeau (Muylkens *et al.*, 2007).

Les méthodes sérologiques ne peuvent être réalisées qu'après séroconversion de l'animal, soit un délai de 2 à 3 semaines après l'infection (Gardeux, 2007). Les méthodes indirectes reposent sur :

Le test de séro-neutralisation (SN) qui est considéré comme le « gold standard » pour la détection des anticorps neutralisants anti-BHV1 (Rocha *et al.*, 2001 ; Vieira *et al.*, 2003). La SN a été largement utilisée dans les enquêtes épidémiologiques, la certification des troupeaux, le dépistage pour la collecte et la commercialisation de sperme, ainsi que dans la recherche clinique (Franco et Roehle, 2007). Cependant, il s'agit d'une technique laborieuse, dépend du maintien d'un stock de virus et de culture cellulaire appropriée. Des variantes de ce test ont été proposées, où la période d'incubation de la neutralisation du virus par les anticorps peut varier de 1 à 24 heures. Le résultat de l'essai est habituellement obtenu en trois à cinq jours (Bitsch, 1978).

La technique ELISA (de l'anglais "enzyme linked immunosorbent assay") est actuellement largement utilisée pour le diagnostic sérologique, en raison de sa haute sensibilité et spécificité, une relative facilité et une rapidité d'exécution. Elle est capable de traiter un grand nombre d'échantillons. Les réactifs sont généralement peu coûteux, stable, facile à préparer (Nandi *et al.*, 2008). Plusieurs variétés de tests ELISA (indirect, direct, de compétition) ont été développées pour le dépistage des échantillons de sérum bovin (Nandi *et al.*, 2007).

Dans le test ELISA de compétition, les anticorps sont dirigés contre gB, car gB est un antigène majeur qui induit une forte réponse immunitaire et ses anticorps persistent deux à trois ans. Le test ELISA gB présente donc une bonne sensibilité (Limbourg *et al.*, 2002). Cependant la protéine gB est hautement conservée entre les différents herpesvirus de ruminants. Des réactions croisées sont possibles mais rares. Par conséquent, la spécificité du test est limitée lorsque les bovins sont en contact avec d'autres ruminants.

La technique ELISA de compétition utilisant gE a été développée parallèlement à l'élaboration de vaccins délétés gE, associés au programme d'éradication d'IBR. Elle permet de différencier les animaux infectés (séropositifs envers gE), des animaux vaccinés (séronégatifs envers gE) (Wellenberg *et al.*, 2001). Toutefois, elle a pour conséquence une diminution de la sensibilité (Limbourg *et al.*, 2002 ; Kramps *et al.*, 2004).

L'hémagglutination passive, la fixation du complément et l'immunofluorescence sont pratiquement abandonnées (Cassard, 2003).

Herpes virus bovin (BHV de type 4)

Le diagnostic peut être réalisé par la mise en évidence du virus de façon directe (isolement viral ou mise en évidence du génome ou des antigènes viraux) ou indirecte (démonstration d'une réponse immune dirigée contre le BHV4).

Le diagnostic indirect repose sur la démonstration de la présence ou du passage du BHV4 par la détection d'une réaction immune humorale spécifique dirigée contre le virus. Ce diagnostic repose sur la mise en évidence des anticorps anti-BHV4 par différents tests tels que les réactions immuno-enzymatiques ELISA (ou Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Edwards et Newman, 1985), notamment l'ELISA indirecte (Carpinschi *et al.*, 2009), le Dot Immunobinding Assay ou DIA, décrit comme une forme modifiée d'ELISA (Essmail *et al.*, 1999 ; Naeem et Goyal, 1990), les tests d'immunofluorescence notamment indirecte ou IFI (Leboeuf, 2009) et les tests d'épreuve d'immunoperoxydase sur monocouche de culture cellulaire ou IPMA pour ImmunoPeroxidase Monolayer Assay (Wellenberg *et al.*, 1999).

Par ailleurs, d'autres tests mettant en jeu les propriétés biologiques des anticorps anti-BHV4 ont été développés, à titre d'exemple, la réaction de fixation du complément (Guo *et al.*, 1988). Cependant, le test de seroneutralisation n'est pas utilisable chez les bovins (Edwards et Newman, 1985), car les bovins infectés par le BHV4 produisent peu voire pas d'anticorps neutralisants à l'égard de ce virus. De plus, la réponse est faible et transitoire (Essmail *et al.*, 1999).

A l'instar des autres gammaherpèsvirus, le BHV4 a la capacité d'établir une latence chez l'hôte infecté et possède un faible pouvoir immunogène. Ainsi, pour compléter les résultats sérologiques et vérifier une suspicion, la détection du virus ou l'ADN viral est devenu nécessaire (Fabian et Egyed, 2004).

Le diagnostic direct d'infection par le BHV4 peut reposer sur deux principales méthodes, la première méthode est l'isolement viral (IV) suivi d'un test d'immunofluorescence indirecte (IFI) pour identifier les souches et la deuxième est l'extraction d'ADN par amplification génomique (PCR) ou par hybridation *in situ*.

Le diagnostic de certitude reste l'isolement viral (IV), il peut se réaliser sur des prélèvements d'avortement (placenta) mais reste difficile en pratique. Cependant, ce test nécessite une culture

pendant trois jours sur cellules primaires de rein de fœtus bovin, avant l'utilisation de l'IFI à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques (Treilles *et al.*, 2013).

Le diagnostic par PCR utilise des amorces spécifiques, tel le gène codant pour la glycoprotéine gB (Boerner *et al.*, 1999) ou la thymidine kinase (Egyed *et al.*, 1996 ; Egyed et Bartha, 1998 ; Wellenberg *et al.*, 2001). La recherche de fragments d'ADN propres au BHV4 par hybridation (dot-blot, Southern blot) après amplification génomique par PCR est décrite comme la méthode d'avenir (Deim *et al.*, 2007). Autres variétés de PCR ont été développées plus tard, telle que la PCR nichée, qui présente une grande sensibilité comparée à la PCR classique (Donofrio *et al.*, 2000b ; Egyed *et al.*, 1996). Fabian et Egyed (2004), ont développé un test de PCR nichée duplex pour la détection conjointe des gammaherpèsvirus BHV4 et AIHV1 à partir d'un même échantillon pour éviter les réactions croisées qui existent entre les deux virus avec certains tests sérologiques. la PCR en temps réel ou Rt-PCR (Real-time PCR, test quantitatif) a récemment été développée en France et réalisée à partir d'écouvillons vaginaux ou placentaires (Treilles *et al.*, 2013). En effet, la PCR présente plusieurs avantages : une très bonne sensibilité, un délai d'obtention des résultats plus court que pour les autres techniques, détection des animaux porteurs latents, la viabilité du virus non obligatoire et enfin elle peut être réalisable sur un grande variété échantillons (écouvillons vaginaux, placentaire, lait...).

Le virus de Schmallerberg

Le diagnostic direct repose sur l'isolement viral et sur les méthodes moléculaires.

Le SBV peut être isolé sur culture cellulaire. L'isolement se fait à partir de tissus infectés après inoculation dans différentes lignées cellulaires, telles que des cellules larvaires de *Culicoides variipennis* (KC), des cellules rénales de hamsters (BHK-21) ou de singes (VERO) (Doceuil *et al.*, 2013). Le FLI a ainsi isolé le SBV à partir d'un échantillon de sang d'une vache malade. L'effet cytopathique (ECP) du virus, non décrit, a été observé au bout de 5 jours (Hoffmann *et al.*, 2012).

Pour les méthodes moléculaires, au départ, la première génération de RT-PCR en temps réel (ou RT-qPCR) ciblait le segment L du génome viral. Mais une seconde génération, ciblant le segment S, a fait preuve d'une meilleure sensibilité (Van der Poel, 2012).

En France, deux kits ont été validés par le laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort : le kit *Adiavet™ Schmallerberg virus realtime* du fournisseur Adiaène et le kit *TaqVet™ Schmallerberg Virus – S Gene* du fournisseur LSI. Ils sont tous deux utilisés dans les

laboratoires agréés pour le diagnostic du SBV par RT-PCR (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2015). Dans le cadre du diagnostic par RT-PCR en temps réel, les échantillons les plus souvent testés sont le sang (chez les adultes lors d'infections aiguës) et le cerveau (chez les nouveau-nés malformés). Une étude a montré que le cordon ombilical, le liquide amniotique et le méconium, échantillons faciles à prélever, pouvaient également être utilisés et donner de bons résultats (Bilk *et al.*, 2012).

Les méthodes indirectes font appel entre autres à la recherche d'anticorps anti-SBV par l'utilisation de tests sérologiques tels : la séroneutralisation, le test ELISA ou encore l'immunofluorescence indirecte.

Chez les nouveau-nés, la recherche d'anticorps anti-SBV n'est significative qu'avant l'ingestion du colostrum et donc des anticorps maternels. En effet, la prise de colostrum est susceptible d'induire un résultat faussement positif par détection des anticorps maternels (ANSES, 2014).

Un test de séroneutralisation, réalisé à partir d'un isolat de SBV provenant du tissu cérébral d'un agneau malformé puis cultivé cinq jours sur des cellules VERO, a permis de mettre en évidence les anticorps anti-SBV avec une sensibilité proche de 100% et une spécificité supérieure à 99% (Loeffen *et al.*, 2012). Un test de séroneutralisation par réduction des plages de lyse a également été mis au point (Mansfield *et al.*, 2013). Bien qu'hautelement sensibles et spécifiques, ces méthodes présentent cependant quelques inconvénients : l'automatisation est impossible, les résultats ne sont interprétables qu'au bout de quatre à six jours et elles nécessitent de surcroît des cultures cellulaires (Doceul *et al.*, 2013).

Actuellement, deux trousse sont disponibles pour les échantillons de sérum et de plasma (*ID Screen® Schmallerberg virus Indirect Multi-species* et *ID Screen® Schmallerberg virus Competition Multi-species*). Le même laboratoire fournit aussi un kit ELISA permettant la détection des anticorps anti-SBV dans le lait (*ID Screen® Schmallerberg virus Milk Indirect*), doté d'une excellente corrélation avec le test sérique (ID-VET, 2013). Un test ELISA basé sur le SBV entier a aussi été mis au point (Van Der *et al.*, 2013).

Le sérum à tester est mis en contact avec l'antigène viral immobilisé sur un support solide. Après une étape de lavage, des anticorps (appelés « conjugués ») dirigés contre les anticorps recherchés sont ajoutés. Ces anticorps conjugués sont couplés à des

fluorochromes. La lecture est effectuée en microscopie optique à fluorescence (Mammette, 2002).

Neospora caninum

N. caninum étant un parasite intracellulaire, la réponse immunitaire la plus protectrice viendra de l'immunité cellulaire (Innes *et al.*, 2000 ; 2002) ; néanmoins, des anticorps spécifiques sont détectés dans le sérum des animaux infectés (Uggla *et al.*, 1998 ; De Marez *et al.*, 1999 ; Maley *et al.*, 2001). La recherche de ces anticorps est à la base du développement de tests de diagnostic sérologique.

Le développement de tests sérologiques spécifiques, sensibles et peu coûteux a été essentiel pour l'accumulation d'un maximum de connaissances sur la biologie et l'épidémiologie de *N. caninum* (Björkman et Uggla, 1999).

Les méthodes sérologiques sont des méthodes indirectes car on ne recherche pas le parasite mais bien une trace de son passage chez l'individu. En effet, suite au contact avec le parasite, l'animal va développer des anticorps spécifiques présents dans le sérum. Ces derniers, témoignent d'un contact plus ou moins récent entre l'animal et le parasite (Björkman et Uggla, 1999).

La sérologie est quasiment la seule alternative utilisée pour identifier des animaux *in vivo* (*ante-mortem*) infectés par *N. caninum* et fournir certaines informations sur le stade de l'infection (Jenkins *et al.*, 2002). Elle peut être utilisée non seulement chez l'animal vivant (adulte, veau) mais aussi pour examiner les avortons lorsque la maturité de leur système immunitaire est acquise. Le sang fœtal, les fluides séro-sanguinolents des cavités pleurales ou péritonéales et le contenu de la caillette peuvent contenir des anticorps spécifiques de *N. caninum* (Jenkins *et al.*, 2002).

La détection d'anticorps spécifiques dans le sérum maternel et fœtal peut se révéler utile pour le diagnostic des avortements à *N. caninum* et pour étudier l'épidémiologie du parasite au sein des troupeaux (Dubey et Schares, 2006). Cependant, il n'est pas judicieux de se fier à un titre d'anticorps élevé chez la mère et/ou son fœtus pour conclure à un avortement à *N. caninum*. Un titre d'anticorps élevé ne signe pas systématiquement un avortement à *N. caninum* (Weston *et al.*, 2005).

Depuis l'isolement et l'identification de *N. caninum*, une série de tests sérologiques a été développée pour l'utilisation chez le chien, le bœuf et chez d'autres espèces hôtes potentielles. Le but est de détecter spécifiquement les anticorps dirigés contre *N. caninum* (Björkman et

Uggla, 1999).

Ces techniques incluent essentiellement l'Indirect Fluorescence Antibody Test (IFAT) (Dubey *et al.*, 1988b ; Conrad *et al.*, 1993b), de nombreux ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Dubey *et al.*, 1996b ; Schares *et al.*, 1999c), le test d'agglutination directe (DAT) (Packham *et al.*, 1998 ; Romand *et al.*, 1998) ou encore l'immunoblotting (IB) (Bjerkas *et al.*, 1994 ; Björkman *et al.*, 1994 ; Pare *et al.*, 1995b ; Schares *et al.*, 1998 ; 1999a ; Atkinson *et al.*, 2000a).

Toutes ces techniques sont confrontées au même problème qui est celui de la détermination de la valeur seuil (*cut off*). Il n'y a pas toujours de valeur seuil établie ni de tests standardisés disponibles (Björkman et Uggla, 1999). En effet, le choix de la valeur seuil pour chaque test est controversé. Dans les tests sérologiques, les titres et l'intensité de la réponse dépendent de plusieurs facteurs à savoir : la composition de l'antigène, les anticorps secondaires (conjugués), les autres réactifs, l'âge de l'animal... (Dubey, 1999).

Afin de valider un test, des sérums définis dits de référence ou de référence relative obtenus à partir de populations étudiées doivent être analysés afin de déterminer la précision du test et le seuil approprié avant que toute investigation sur terrain ne puisse être conduite (Jenkins *et al.*, 2002).

Cependant, chez les bovins, les titres spécifiques fluctuent durant la gestation et ils peuvent avec certains tests diminuer même au-dessous des limites de détection (Conrad *et al.*, 1993b ; Dannatt, 1997). D'autre part, en cas d'infection chronique sous forme de bradyzoïtes, la sérologie peut se révéler négative en raison du faible degré de stimulation antigénique réalisé par les formes enkystées. En conséquence, si le seuil de positivité est placé trop haut, on risque de générer des faux négatifs.

Les réactions croisées éventuelles sont souvent liées à la nature de la préparation antigénique ainsi qu'à la dilution du sérum utilisé (Hanukoglu, 1990).

De nombreux tests sérologiques utilisant des tachyzoïtes de *N. caninum* totaux comme source d'antigènes ont le potentiel de réduire la spécificité. En effet, les résultats faux positifs qui sont dus aux réactions antigéniques croisées peuvent exister à cause de l'étroite parenté entre *Neospora* et les autres membres de la famille des Sarcocystidés tel *T. gondii* et *Sarcocystis spp* (Bjerkas *et al.*, 1994 ; Hemphill et Gottstein, 1996).

Les méthodes directes de détection du parasite sont indispensables pour mettre en évidence la présence du parasite et/ou de lésions histo-pathologiques résultant de l'infection, directement à partir d'un tissu. Pour ce faire, plusieurs approches sont utilisées : l'histologie,

l'immunohistochimie, l'amplification génétique ou encore les inoculations d'animaux ou la culture cellulaire (Dubey et Lindsay, 1993).

Trichomonas fetus

Le diagnostic clinique ne conduit qu'à la suspicion dans le troupeau, notamment à partir de la combinaison de retours excessifs en chaleur, d'endométrites, de décharges vaginales purulentes, d'avortements et de pyomètres. C'est, le plus souvent, l'examen du taureau utilisé dans l'élevage qui permettra d'établir la confirmation du diagnostic par examen direct du liquide de lavage préputial et mise en culture.

La recherche du parasite dans les écoulements purulents vaginaux et/ou l'estomac de l'avorton conduira également à la confirmation du diagnostic. Toutefois, ce diagnostic, s'il est facile d'interprétation, requiert l'utilisation d'un prélèvement correctement réalisé (lavage avec un massage vigoureux du sac préputial) et examiné très rapidement (le *trichomonas* meurt en moins de 6 heures hors de l'organisme) à température correcte (37°C), le mouvement du flagellé étant largement diminué, voire supprimé aux températures inférieures. Le recours aux laboratoires mobiles qui permettent de faire l'examen et la mise en culture « sur place » confère une sécurité élevée et une fiabilité bien plus grande aux résultats obtenus.

Le diagnostic sérologique ou par muco-agglutination est très aléatoire compte tenu du faible pouvoir immunogène du trichomonas (même au niveau des anticorps locaux).

Les techniques de biologie moléculaire qui utilisent la technologie de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été développées pour l'identification de *T. fetus* (Ho *et al.*, 1994 ; Felleisen *et al.*, 1998 ; Parker *et al.*, 2001 ; Campero *et al.*, 2003). Des études antérieures ont démontré que la PCR est capable de détecter un très petit nombre de parasites issus de culture de laboratoire en l'absence de matériel préputial (Ho *et al.*, 1994 ; Felleisen *et al.*, 1998), ainsi que dans du matériel préputial (Ho *et al.*, 1994 ; Felleisen *et al.*, 1998 ; Parker *et al.*, 2001). Cependant, dans les échantillons préputiaux, un nombre élevé de parasites est nécessaire pour donner un résultat PCR positif, cela étant probablement dû à l'inhibition par les composants du smegma préputial. Plusieurs techniques d'extraction de l'ADN ont été décrites (Ho *et al.*, 1994 ; Felleisen *et al.*, 1998 ; Parker *et al.*, 2001) et il est probable que la sensibilité de l'épreuve de diagnostic sera influencée par l'efficacité de la méthode d'extraction et les procédures utilisées pour vaincre les inhibiteurs contaminants. La spécificité diagnostique de l'épreuve par PCR

dépend beaucoup de la spécificité des amorces. Un jeu d'amorces (Ho *et al.*, 1994) a donné des produits non spécifiques de taille similaire dans approximativement un tiers des échantillons témoins négatifs (Felleisen *et al.*, 1997) et ne devrait pas être utilisé pour le diagnostic. Un jeu d'amorces basé sur la séquence 5,8 de l'ARN ribosomal a démontré une bonne spécificité diagnostique dans les échantillons issus d'animaux négatifs (TFR3 et TFR4, Felleisen *et al.*, 1998), et sont les amorces les plus fréquemment citées dans la littérature. Cependant ces amorces produisent des produits d'amplification à partir de certains autres flagellés étroitement apparentés (*Tritrichomonas suis*, *T. mobilensis* et un trichomonas du chat) qui sont indistincts de ceux de *T. fetus* (Felleisen *et al.*, 1998, Gookin *et al.*, 2002). Ces espèces ne peuvent pas être distinguées au microscope et il est possible que certaines de ces espèces soient synonymes de *T. fetus*. Un travail récent a démontré que ces amorces peuvent être utilisées pour faire la différence entre *T. fetus* et des trichomonas autres que *T. fetus* parfois trouvés dans les échantillons préputiaux (Bondurant *et al.*, 1999 ; Campero *et al.*, 2003 ; Parker *et al.*, 2003). La sensibilité et la spécificité de ces épreuves diagnostiques doivent encore être précisée sur un échantillon adéquat d'animaux positifs et négatifs, bien que la recherche jusqu'à maintenant laisse à penser que la spécificité est bonne (Campero *et al.*, 2003 ; Rhyan *et al.*, 1995). La sensibilité des tests PCR a été estimée égale à celle du kit de culture InPouchTM TF (Campero *et al.*, 2003), mais sur très peu d'animaux. Selon une étude récente, plusieurs différentes approches sur la base de travaux précédents qui utilisaient le couple d'amorces (TFR3 et TFR4 ; Felleisen *et al.*, 1998) ont diagnostiqué spécifiquement *T. fetus*. Pour faire la distinction entre des organismes considérés comme des contaminants fécaux des organes de la reproduction des bovins, d'une part, et *T. fetus* d'autre part (Campero *et al.*, 2003), une Étude utilisait deux couples d'amorces, un couple amplifiant l'ADN du groupe trichomonas (TFR1 et TFR2 ; Felleisen, 1997) et l'autre spécifique de *T. fetus* (TFR3 et TFR4 ; Felleisen *et al.*, 1998). Une alternative proposait d'utiliser les amorces génériques (TFR1 et TFR2 ; Felleisen, 1997) pour amplifier l'ADN puis de différencier les différentes espèces de trichomonas en utilisant une analyse RFLP (Hayes *et al.*, 2003). Dans une troisième étude, un autre couple d'amorces a été conçu pour amplifier des appliquons de tailles différentes à partir de protozoaires trichomonas, permettant ainsi de distinguer différentes espèces (Grahm *et al.*, 2005). Il a été aussi démontré qu'un test PCR peut être utilisé pour détecter l'ADN de *T. fetus* dans des tissus d'endomètre ou de fœtus avortés fixés dans du formol (Bondurant *et al.*, 2003).

V. Lésions observées chez l'avorton en fonction de l'agent infectieux

Pour un avortement dû à *N. caninum* (figure 2), les lésions sont fréquemment observées dans le cerveau, le cœur, le foie et les muscles squelettiques (Wouda *et al.*, 1997b ; Dubey *et al.*, 2007a).

L'analyse histo-pathologique est une étape importante pour le diagnostic de la néosporose. L'entièreté du fœtus doit idéalement être soumise à l'analyse et si ce n'est pas possible, le cerveau, le cœur et le foie doivent être analysés.

Lorsque l'état des tissus le permet, une coloration classique à l'hématoxyline-éosine donne la possibilité de visualiser les lésions éventuellement présentes.

L'examen histo-pathologique des tissus fœtaux révèle de l'encéphalomyélite non suppurative subaiguë, multifocale, caractérisée par des foyers d'infiltration de cellules inflammatoires mononuclées autour d'une région centrale de nécrose. De la myocardite et de l'hépatite subaiguës ont également été rapportées (Anderson *et al.*, 1991 ; Barr *et al.*, 1991b). Des foyers de nécrose peuvent être observés au niveau du cerveau, du cœur et du foie (Barr *et al.*, 1990 ; 1991b ; Anderson *et al.*, 1994).

Les lésions placentaires typiques sont confinées aux cotylédons et consistent en des foyers de nécrose, une inflammation non suppurative et des tachyzoïtes dans les trophoblastes (Dubey et Schares, 2006).



Figure 2 : Avorton de la néosporose (DerMeerschman *et al.*, 2005)

Dans le cas de la brucellose (figure 3), l'avortement s'accompagne habituellement de rétention placentaire et de métrite (Gibbons *et al.*, 1974). Des lésions de gravités variables sont retrouvées au niveau de l'utérus, au fur et à mesure que l'infection progresse, l'endométrite évolue d'une forme aiguë à une forme chronique. La cavité utérine contient une quantité variable d'exsudat gris sale, visqueux, chargé de flocons purulents de volume variable. Les cotylédons de la matrice, nécrotiques et de couleur gris jaunâtre. Le placenta intercotyledonnaire est par endroits, épaissi, œdémateux et exsudatif (Lefèvre *et al.*, 2003). Les avortons présentent un œdème sous cutané important et les cavités splanchniques contiennent un exsudat sérosanguinolant, parfois accompagné de pleuropneumonie au niveau thoracique. Cependant, certains fœtus ne présentent pas de lésions macroscopiques significatives (Lefèvre *et al.*, 2003).

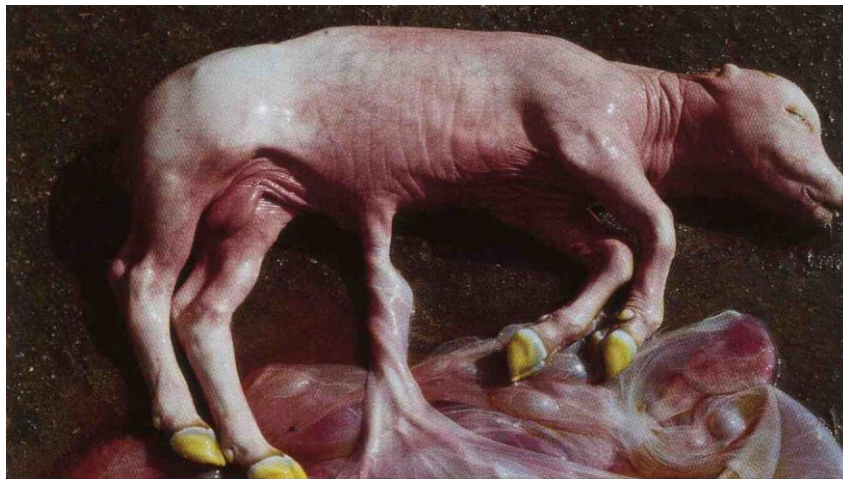


Figure 3 : Avorton brucellique (2^{ème} moitié de la gestation) (Bazin *et al.*, 1994)

Il n'existe pas de lésions véritablement pathognomoniques de la leptospirose. Les avortons ont cependant entre 50 ml et 1 litre de liquide sero-sanguinolant dans les cavités péricardiques, pleurale et péritonéale. Une hémorragie dans la graisse périnéale avec accumulation sous cutané et intermusculaire de sang hémolysé et de sérum sont courantes. De même, on découvre souvent dans la caillette un liquide clair et jaune (Gibbons *et al.*, 1974).

Les enveloppes fœtales sont œdémateuses et présentent un début d'autolyse au moment de l'avortement, l'avorton présente une autolyse marquée. On peut noter un œdème sous-cutané

ainsi que des épanchements hémorragiques dans les cavités abdominales et thoraciques. Le foie apparaît marbré et il y a des pétéchies sur la rate (Mathon, 1979).

Pour les avortons, l'autolyse est la cause des lésions non spécifiques observées, ainsi on peut mettre en évidence un ictère des tissus sous-cutanés.

Au contraire, pour les fœtus nés vivants, on va constater des lésions comparables à celles produites par l'anoxie, avec des pétéchies sur la surface de la thyroïde, de thymus, des poumons, du cœur et de la plèvre pariétale. Dans le cas de fœtus avortés par *L. hardjo* ou *L. icterohaemorrhagiae*, des cas de lésions vasculaires sévères essentiellement dans le foie mais aussi à un moindre degré, dans les méninges cérébrales et les septa interlobulaires des poumons ont été observés. Il se produit alors une congestion vasculaire, une nécrose et une hémorragie périvasculaires.

Les cotylédons sont aussi touchés dans le cas d'avortement à *L. pomona*, qui sont apparus jaunâtres et avasculaires de façon uniforme (Berger, 1999).

Pour la salmonellose, les lésions sont présentées par un placenta avec des inflammations peu spécifiques, avec parfois une nécrose ou des hémorragies des cotylédons, le fœtus peut présenter un œdème sous-cutané, congestion, nécrose du foie et des poumons (Camart, 2006).

Lors de listeriose, l'avortement s'accompagne également de rétention placentaire (Hugron *et al.*, 2005). Le fœtus peut être emphysémateux ou momifié (Goyon, 1980).

Le fœtus ne présente pas habituellement de lésions typiques en cas de présence de fièvre Q. Le placenta par contre est épaissi, présente des plaques blanchâtres crayeuses surtout dans les zones intercotyledonnaires (Hanzen, 2005).

La chlamydie provoque des avortements faisant suite à une placentite chronique (le placenta est enflammé et les cotylédons nécrosés) (Hanzen, 2005 ; Hugron *et al.*, 2005).

En Europe *Chlamydia psittaci* est associée à l'avortement plutôt sporadique entre le 3^e et le 7^e mois de gestation dû à une placentite nécrotique et une attaque directe du fœtus avec lésions hépatiques (Jaskowski, 1973).

Campylobacter fetus est à l'origine de rétention placentaire, le fœtus ne présente aucune lésion caractéristique. Le placenta est œdémateux et a l'aspect du cuir (Hanzen, 2005).

L'infection par le BHV-1 provoque chez le fœtus des lésions de nécrose multifocale généralisée, avec une réaction inflammatoire modérée. Le cortex rénal est détruit (Lefèvre *et*

al., 2003). L'avorton est autolysé, présentant une lésion de base qui est un foyer nécrotique accompagné d'une réponse inflammatoire, tandis que le placenta est œdémateux avec des plages de décoloration brunes conséquences d'une cessation de la circulation placentaire (Boyer, 1981).

Il semble que l'action du BVDV concerne plus particulièrement le placenta provoquant une placentite et non le fœtus lui-même, quand l'infection a lieu entre le 1^{er} et 5^{ème} mois de gestation (Grooms, 2004). Par la suite, les fœtus avortons présentent de l'œdème sous-cutané, et des épanchements pleuraux et péritonéaux abondants (OIE, 2008).

VI. Impact économique des avortements

En Afrique, la sous-alimentation est devenue un problème majeur et de nombreux pays ont mis en place des moyens de lutte, passant par les politiques de production animale. Ainsi, l'élevage qui est l'un des piliers de ces politiques est confronté à des contraintes, notamment des contraintes d'ordre génétiques, alimentaires, sanitaires et climatiques. La satisfaction de la demande en produits carnés et laitiers demeure ainsi tributaire des importations. Pour pallier les dépenses énormes liées à ces importations, nombreux pays ont adopté une politique d'appui aux productions animales en vue d'une autosuffisance par l'entremise d'un vaste programme d'amélioration génétique du cheptel autochtone grâce notamment à la biotechnologie de l'insémination artificielle.

Les résultats enregistrés par différents programmes d'insémination artificielle montrent une faiblesse des taux de réussite. Plusieurs contraintes sont la cause de ces résultats. Parmi ces contraintes le problème de non maîtrise des paramètres de reproduction chez la vache, l'alimentation et surtout les avortements. En effet, chez la vache, les avortements sont économiquement très graves pour l'éleveur, car le fœtus c'est -à- dire le futur veau est perdu et limitent ainsi l'élevage à sa source. Qui plus est, des affections de la sphère génitale et une stérilité peuvent en résulter, et cela pendant une période plus ou moins longue au cours de laquelle la femelle improductive est une charge pour l'éleveur (Gatsinzi, 1989). En Afrique, si de nombreuses études ont été menées sur les pathologies abortives les plus en vue telles que la brucellose (Akakpo *et al.*, 1994), la chlamydiose et la fièvre Q (Kpomassi, 1991), la néosporose (Mukakanamugire, 2008) sans doute en raison des pertes économiques considérables qu'elles engendrent, les enquêtes sur la BVD et l'IBR restent insuffisantes. En effet, hors Afrique, des études ont montré que la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR) et la Diarrhée Virale Bovine (BVD) sont deux des plus communes causes virales d'avortement chez les bovins (Smith,

1990). Le taux d'avortements dans un troupeau peut atteindre de 25 à 60 % (Youngquist *et al.*, 2007). L'importance économique est considérable. En effet, les maladies abortives entraînent une réduction de la productivité du cheptel bovin du fait des mortalités des adultes mais surtout des jeunes et des avortements. Elles limitent l'élevage à sa source et constituent ainsi un frein aux tentatives d'amélioration génétique. Sur ce, il faut ajouter des pertes indirectes résultant des entraves aux échanges commerciaux d'animaux et produits dérivés, de la saisie des animaux suspects, de l'interdiction d'exportation vers les pays indemnes et du coût de la prophylaxie.

Les maladies infectieuses peuvent avoir un fort impact sur la fertilité du mâle et de la femelle. Une douleur causée par une infection au niveau des membres ou de l'abdomen peut empêcher le taureau de saillir, elle peut aussi mener à la libération de corticoïdes qui ont un effet néfaste sur la production de semence. Une infection avec de la fièvre et une augmentation de la température des testicules aura aussi des effets négatifs sur cette même production. Par ailleurs, une infection du pénis, des testicules ou des glandes annexes peut conduire à une semence de mauvaise qualité et donc à des problèmes de fertilité. Concernant la femelle, les maladies infectieuses affaiblissent l'animal et rendent plus difficile l'obtention d'une Note d'Etat Corporel suffisante avec une conséquente dégradation de la fertilité. Les problèmes infectieux au niveau des membres peuvent être à l'origine d'un anœstrus ou d'une sous-expression des chaleurs. De plus, les contaminations de l'utérus (souvent par germes non-spécifiques) dans la période suivant la mise-bas rendent l'environnement utérin défavorable à la fécondation. Ces métrites, endométrites et pyomètres empêchent par ailleurs la sécrétion de GnRH et LH, hormones essentielles pour la cyclicité de la femelle (Peter *et al.*, 1989).

Dans les cas où une fécondation a bien eu lieu, de nombreux agents pathogènes sont à l'origine d'importantes pertes embryonnaires et fœtales puisqu'ils peuvent entraîner une interruption de la gestation. Citons notamment les cas du virus de la BVD, du virus *Herpès* responsable de l'IBR, de bactéries tels que *Campylobacter* et *Listeria* et du protozoaire responsable de la néosporose. Par ailleurs, une infection avec une diminution de l'ingestion et donc une diminution de l'énergie disponible pour le maintien de la gestation peut entraîner un avortement.

En plus de leur importance économique, les avortements ont une importance sanitaire et hygiénique car une part importante des avortements est due à des agents infectieux zoonotiques, et certaines de ces zoonoses sont loin d'être bénignes d'un point de vue médical

(Brucellose, etc). Du point de vue étiologique, les causes majeures des avortements sont nombreuses et multiples et varient en fonction de la période ou du stade de la gestation.

Les facteurs étiologiques de mortalités embryonnaires, certains sont parfois plus impliqués dans un type de mortalité que dans l'autre. Ces facteurs peuvent être regroupés dans quatre (4) grandes catégories : les facteurs gamétiques et embryonnaires, les facteurs parentaux, facteurs biologiques et les facteurs environnementaux.

Quant aux facteurs associés aux avortements cliniques, ils sont nombreux et très variés. Ainsi, ces facteurs sont de nature biologique telles les bactéries, les virus et les parasites ; ou non biologiques comme les facteurs nutritionnels, chimiques, physiques, génétiques ou iatrogènes.

Notons que dès le premier mois de gestation, de nombreux signaux spécifiques (PAGs, progestérone, EPF, œstrogènes, etc....) et non spécifiques (protéines totales, albumine, globuline, etc..) sont émis par le conceptus, mais seuls les paramètres spécifiques de la gestation permettent de surveiller les relations fœto-maternelles ou de déterminer les avortements pendant toute la durée de la gestation. Néanmoins, différents auteurs montrent que la quantification des avortements au sein des exploitations bovines relève le plus souvent de l'association de plusieurs méthodes. Il s'agit de méthodes hormonales par des dosages de progestérone, dosage de PAGs, dosage des œstrogènes, dosage de l'EPF et dosage conjointe de progestérone et PAGs ; méthodes paracliniques (échographie et l'effet doppler) et enfin les méthodes cliniques passant par la palpation transrectale et la notation du retour en chaleur de l'animal.

Enfin, les avortements représentent une forte composante de l'infertilité dans l'espèce bovine et ses impacts économiques sont importants. Cependant, plusieurs stratégies de lutte ont été proposées pour limiter ce fléau de l'élevage bovin. Il s'agit d'une part de mesures offensives principalement les mesures thérapeutiques (hormonales et alimentaires) et les mesures d'assainissement du troupeau ; et d'autre part de mesures défensives qui consistent à éviter une éventuelle contamination verticale ou horizontale.

Les problèmes de fertilité et fécondité du troupeau ont souvent plusieurs causes. La fertilité est en effet influencée par de nombreux facteurs génétiques, sanitaires et de conduite du troupeau. En ce qui concerne les aspects sanitaires, le combat repose sur la prévention et le traitement.

Les mesures de prophylaxie sont les programmes de vaccination, de dépistage et d'éradication, le nettoyage et désinfection du matériel et des bâtiments, le vide sanitaire, la quarantaine, l'isolement des animaux malades... et l'utilisation de l'Insémination. Les paillettes de semence produites en centre de collecte agréé proviennent d'éjaculats de taureaux contrôlés très régulièrement par le laboratoire du Centre National d'Insémination Artificielle et d'Amélioration Génétique (CNIAAG). Elles devraient être d'une qualité sanitaire irréprochable : garanties sans IBR, BVD, campylobactériose, trichomonose et bien d'autres maladies.

Un suivi régulier des femelles est aussi très important. L'utilisation de l'échographie après la mise-bas pour un contrôle de l'involution utérine et plus tard pour les constats de gestation permettra une détection précoce des problèmes et donc une action corrective en temps utile.

Ainsi, devant l'impérieuse nécessité de gérer le potentiel reproducteur de la population animale et d'accroître sa productivité par tous les moyens dont l'IA, il y a lieu de revoir des stratégies de diagnostic et de lutte contre les facteurs associés aux avortements dans l'espèce bovine. Ces avortements méritent par conséquent une attention particulière que ce soit au niveau des responsables chargés d'élaborer les politiques de développement de l'élevage et des organismes de recherche qui s'intéressent aux problèmes de reproduction du bétail qu'au niveau des éleveurs dans la gestion de leurs troupeaux pour mieux lutter contre ce fléau en Afrique subsaharienne, car aucun programme d'IA malgré ses bonnes ambitions, ne peut parvenir à ses fins avec le taux d'avortement élevé en élevage bovin.

A titre d'exemple, Ayayi *et al.* (2009) ont rapporté qu'en Afrique l'importance économique de la brucellose est mal perçue dans les différents pays. L'avortement semble occuper la première place des effets négatifs de la maladie sur le cheptel, suivie de la mortinatalité, de l'infertilité, de la baisse de la production laitière puis de l'allongement de l'intervalle entre les vêlages. Quant à l'estimation économique très peu de pays abordent l'estimation économique, sans doute à cause de l'absence de données, tant sur le plan du financement de la lutte que de l'évaluation des pertes économiques directes et du manque à gagner. Ainsi, l'Algérie, le Gabon, la Mauritanie, le Maroc, la RDC, la Tanzanie, la Tunisie et le Swaziland ont donné quelques indications sur le coût annuel de la lutte. Les pays bénéficient d'un financement public ou privé (éleveurs). Les financements publics s'élèvent à 19 459 € au Swaziland, à 20 890 € en Tanzanie et enfin à 1 897 288 € en Algérie. Au Swaziland les pertes économiques liées à l'avortement s'élèvent à 2 900 023 €, tandis que les pertes en lait sont évaluées à 1 272 210 € ; enfin les

pertes d'exportation s'élèvent à 47 384 € (Ayayi *et al.* 2009). La Tunisie et la République Démocratique du Congo (RDC) ont évoqué les pertes économiques dans les avortements, la perte de la force de travail et la chute de la sécrétion lactée, sans en donner une évaluation financière. Des cas humains sont signalés dans 11 pays (Algérie, Erythrée, Guinée, Guinée-Bissau, Kenya, Maroc, Mauritanie, Niger, Soudan, Tanzanie, Tunisie) et ils surviennent à la faveur de la consommation de lait cru, de fromage mou infecté, du contact avec les animaux infectés ou avec le placenta ou l'avorton lors d'avortement brucellique (Ayayi *et al.* 2009). Les personnes à risque sont surtout des éleveurs, mais aussi les bouchers ou les vétérinaires. Après constatation de l'infection, les patients sont souvent admis dans des hôpitaux et sont traités à l'aide d'antibiotiques, soit vont consulter les tradipraticiens comme en Guinée-Bissau, ou alors ne suivent aucun traitement car le coût de celui-ci est parfois élevé. A titre d'exemple, le coût du traitement d'un patient va de 9 € en Tanzanie à 200 € au Maroc et atteint 650 € en Algérie (Ayayi *et al.* 2009).

II. Matériel et méthodes

L'objectif principal de notre projet de thèse est de connaître la situation épidémiologique des principales pathologies infectieuses associées aux avortements chez la vache dans la région d'Alger. Le but est de mettre en place une stratégie d'épidémiologie surveillance efficace pour tenter de réduire l'incidence des avortements dans nos élevages bovins laitiers.

II.1 Description de la région étudiée

La Wilaya d'Alger qui comporte 57 communes et 13 daïras, s'allonge en bordure de la Méditerranée sur une longueur de 90 Km et une largeur pouvant varier de 7 à 25 Km. La Wilaya occupe une position centrale au Nord de l'Algérie, elle est limitée géographiquement par la mer méditerranée au Nord, la wilaya de Blida au Sud, la wilaya de Tipaza à l'Ouest jusqu'à l'Oued Mazafran et enfin, par la wilaya de Boumerdès à l'Est jusqu'à la commune de Réghaia. Son relief se caractérise par trois sous zones agroécologiques (AGE) homogènes longitudinales qui sont :

- Le Sahel : en forme de sommet plat, il constitue une région de collines aux formes douces, d'altitudes variables, généralement plus de 200 m à l'Ouest de la baie d'Alger avec un point culminant de 407m à Bouzaréah.
- Le Littoral : dominé par le Sahel, avec un relief peu prononcé et une pente générale orientée vers le Nord. On peut distinguer le Littoral Est et le Littoral Ouest.
- La Mitidja : est située au sud d'Alger, d'une altitude variant de 50 m à 100 m. Elle est constituée d'alluvions formant des sols de bonne fertilité. La basse Mitidja, à l'Est d'Alger, est traversée par les Oueds Hamiz et Réghaia.

La région d'Alger bénéficie d'un climat de type méditerranéen doux ou modéré, subhumide, il est d'amplitude thermique faible. La température moyenne annuelle varie entre 16 et 18°C alors que les températures minimale et maximale sont de 12°C en hiver et 36°C en été. Les précipitations pluviales varient entre 670 à 800 mm/an avec un dépassement de 1000 mm/an pour les mois de novembre, décembre et janvier. Les deux contraintes climatiques sont constituées par les vents d'Ouest dominants qui nécessitent des brise-vents et la grêle qui se manifestent en moyenne 12 jours/an sur le Sahel. Il est à noter que le sirocco peut durer jusqu'à 20 jours par an en moyenne (Annuaire Statistiques Alger, 2012).

La saison hivernale s'étend d'octobre à avril, et la saison estivale de juin à septembre. La région est traversée principalement par les vents d'Ouest dominants.

La végétation est caractérisée par une couverture forestière abondante constituée en majeure partie des formations de pins d'Alep et de chênes lièges (BNEDER, 2008).

II.2 Description de l'élevage bovin

La région étudiée dispose de 1281 éleveurs détenant 13 115 têtes de bovins dont 7 514 têtes de vaches laitières (DSA, 2013). L'espèce bovine est subdivisée en trois catégories :

- le BLM (bovin laitier moderne), composé principalement de races européennes notamment la Montbéliarde, la Holstein, la Fleckvieh et la Brune des Alpes. Ce cheptel est orienté vers la production laitière. Il présente un effectif de 91% (DSA, 2013) ;
le BLA (bovin laitier amélioré), constitué des populations issues de croisement anarchique entre les races importées et les races locales ainsi que les races importées entre elles-mêmes. Il représente un effectif de 7% (DSA, 2013) ;
- le BLL (bovin laitier local), constitué de la race locale qui regroupe sous la dénomination « Brune de l'Atlas », 4 rameaux importants (la Guelmoise, la Cherfa, la Chélifienne et la Sétifienne). Il représente un effectif de 2%. Cette race est surtout retrouvée sur les lieux de sa prédilection qui sont les montagnes et les piémonts (DSA, 2013).

Le mode d'élevage est généralement de type semi-intensif. Les animaux sont nourris au foin, au son et à l'herbe pendant la saison de pâturage. Celle-ci va de mars à décembre avec des variations suivant les conditions climatiques. L'association de l'élevage des bovins à celui des ovins et des caprins est fréquente dans cette région.

II.3 Plan d'échantillonnage et enquêtes épidémiologiques

II.3.1. Établissement de questionnaire épidémiologique

Avant la visite des fermes bovines, deux questionnaires épidémiologiques ont été préparés. L'un des questionnaires, inclut des données générales sur l'exploitation telles la taille du cheptel, le mode de reproduction, le type d'élevage, la présence d'avortement (annexe)... et dans le deuxième, nous avons insisté pour recueillir des données individuelles sur chaque animal prélevé telles la race, l'âge, l'origine, antécédents pathologiques, traitements antérieurs, déjà avorté ou jamais (annexe).

Ce type d'enquête descriptive nous permettra de déterminer si la ferme visitée avait connu des

épisodes d'avortement mais aussi de réaliser une étude épidémiologique de type cas-témoin pour mettre en évidence tous les facteurs de risques qui sont associés aux avortements chez la vache dans la région étudiée.

- Un planning de visite des fermes a été établi pour situer les fermes, recueillir les informations et remplir le 1er questionnaire afin de sélectionner les fermes à étudier.
- Les visites ont été programmées deux fois par semaine : le dimanche et le jeudi. Le dimanche, on visitait des fermes situées dans la zone littorale et le jeudi était consacré aux fermes situées dans la zone de la Mitidja.

Cette opération a duré un mois du 15 juin 2011 au 15 juillet 2011

- Le 1er questionnaire nous a permis de sélectionner 54 fermes de type laitier (15 fermes cas et 39 fermes témoins). Les fermes cas sont celles qui ont déjà souffert des problèmes d'avortements et les fermes témoins sont celles qui n'ont pas connu d'épisodes d'avortements. Cette première étape du travail relative à l'enquête épidémiologique a été rendue possible grâce à la collaboration de la DSV qui a mis à notre disposition un vétérinaire de l'inspection vétérinaire de la wilaya d'Alger qui connaît très bien les élevages bovins de la wilaya.

II.3.2. Récolte de différents échantillons

Nous avons entamé nos prélèvements dans les fermes sélectionnées à partir du 15 septembre 2011 et ceci à la demande de la plupart des éleveurs. 90 fermes ont été sélectionnées pour participer à notre étude, toutefois, 54 fermes (15 cas et 39 témoins) ont été prélevées.

Une sortie par semaine était programmée : nous avons ainsi pu prélever sur le même animal : du sang total dans des tubes héparinés, du sang dans des tubes secs et des matières fécales. En total, 360 sérums et sang total bovins ont été prélevés et 360 échantillons de matières fécales ont été récoltés.

En général, 360 vaches ont été analysées comprenant 278 vaches n'ayant jamais avorté (vaches contrôle) et 82 vaches ayant avorté (vaches cas). L'âge de ces vaches est compris entre 1 et 11 ans.

Des prélèvements du mucus préputial ont été effectués sur 45 taureaux.

Parmi les fermes sélectionnées, il n'y a que six (n=6) éleveurs qui ont fait appel à nous pour déclarer des avortements ; nous nous sommes alors déplacés pour prélever la vache (écouvillonnages vaginaux, sang, matières fécales et placentas) et son avorton (cerveau, contenu stomacal, foie, rate, cœur).

II.4. Analyses de laboratoire

1- Récolte du sérum : pour les prélèvements bovins, nous avons ponctionné à chaque fois à partir de la veine coccygienne (caudale) ainsi 10 ml de sang complet ont été prélevés dans un tube sec système vacutainer sous vide et 10 ml de sang total dans un tube hépariné.

Le sang hépariné a été conservé à -20°C et le sang, récolté dans les tubes secs, a été centrifugé à 2700 t/mn et le sérum a été isolé et conservé à -20°C jusqu'à ce que les tests sérologiques soient réalisés.

2- Mise en culture des matières fécales : le but est d'isoler les espèces de *Salmonella* Pré-enrichissement en milieu non sélectif : ensemencement du fond de boîte ou de la pédichiffonnette (prise d'essai) dans un volume d'eau peptonée correspondant à 10% de la masse de la prise d'essai. Incubation durant 24h à 37°C.

Enrichissement en milieux sélectifs liquides : transférer 1ml de la culture obtenue dans un tube contenant 10ml de bouillon Rappaport-Vassiliadis et 0.1ml de la culture dans un tube contenant 10 ml de bouillon sélénite-cystine. Incubation à 42°C pendant 18 à 24 h.

Isolement et identification : ensemencer avec une anse à partir de la culture dans le milieu Rappaport-Vassiliadis la surface d'une gélose XLT4. Opérer de même pour la culture du milieu au sélénitecystine avec une gélose Hektoen. Incubation à 37°C pendant 24 à 48h.

Identification à partir de différents caractères biochimiques

Sérotypage : Recherche par agglutination sur lame des antigènes « O », « Vi » et « H »

3- Mise en culture des écouvillonnages vaginaux, placenta des vaches ayant avorté et du contenu stomacal, foie, rate, cerveau et cœur des avortons bovins : pour la culture de *Listeria monocytogenes*.

Isolement des Listeria sp. à partir de produits pathologiques d'origine animale (COFRAC/CNEVA Pr 116/00/BA 90/00)

Le prélèvement a été homogénéisé en eau peptonée et le broyat a été mis en culture dans un bouillon coeur-cervelle et, parallèlement, ensemencé sur une gélose PALCAM (Polymyxin Acriflavine Li Cl Ceftazidime Esculine Mannitol) modifiée et sur gélose Columbia ANC au sang de mouton.

Après 24 h d'incubation à 37 °C

le bouillon est repiqué sur gélose PALCAM et sur gélose au sang de mouton.

Les milieux gélosés sont incubés à 37 °C, observés tous les jours durant 3 jours et les colonies suspectées (si possible 5 colonies ou plus) sont repiquées sur géloses trypticase soja au sang de mouton, incubées durant 18-24 heures à 37 °C puis identifiées.

Méthode alternative d'isolement des *Listeria* sp. à partir des placentas COFRAC/CNEVA Pr 116/00/BA 90/00

Les enveloppes placentaires sont broyées en eau peptonée de façon à obtenir une dilution comprise entre 1/2 et 1/5 puis directement ensemencées sur gélose PALCAM. Les boîtes sont incubées à 37 °C, observées tous les jours durant 3 jours et les colonies suspectes (si possible 5 colonies ou plus) sont repiquées sur géloses trypticase soja au sang de mouton, incubées durant 18-24 heures à 37 °C puis identifiées.

Mise en évidence de *Trichomonas* fœtus dans le mucus préputial et les sécrétions vaginales
: les échantillons ont été collectés chez les taureaux par lavage préputial et chez les vaches ayant avorté.

Le milieu que nous avons utilisé est le milieu pour *Trichomonas* de Diamond. L'inoculation des échantillons dans le milieu de culture a été faite le plus tôt possible après la collecte. Les échantillons ont été traités par centrifugation. Le culot a été inoculé dans le milieu de culture. La détection des organismes a été faite par microscopie optique, sur une lame humide préparée directement à partir de la culture.

4- Examen Histopathologique (avorton et placenta)

Une autopsie a été pratiquée sur les 06 avortons prélevés. Le cerveau, le cœur, le foie et la rate ont été prélevés. Les organes d'avortons et placenta ont été placés séparément dans des sachets stériles, transportés sur glace. Un fragment de chaque organe a été placé dans du formol 10% pour les études histologiques.

Pour l'examen histologique, des sections de cerveau, cœur, rate et foie de chaque avorton ont été fixées dans 10% de formol, déshydratées, enrobées dans de la paraffine, coupées à 5 µm au microtome et colorées avec de l'hématoxyline-éosine. Le but était de rechercher des lésions compatibles avec certaines pathologies abortives.

Les lésions compatibles avec l'infection par *N. caninum* ont été confirmées par Immuno HistoChimie (IHC) décrite juste après.

Technique d'immunohistochimie

Lorsque des lésions compatibles avec la néosporose sont observées par examen histologique, l'immunohistochimie de *N. caninum* a été réalisée sur des échantillons de cerveau, de cœur ou de foie.

Les réactions immunohistochimiques ont été réalisées avec l'aide d'une procédure automatique (Ventana ES instrument). Chaque série d'analyses comportait un témoin positif vis-à-vis de *N. caninum* (une section de cœur) fourni respectivement par les Drs Dubey (Bestville, USA) et Buxton (Edimbourg, Écosse).

L'avantage de cette technique repose sur le fait qu'elle permet de lier la présence du parasite aux lésions mises en évidence lors de l'analyse histopathologique.

Le test a été appliqué suivant les recommandations du fabricant, le temps d'incubation et la dilution de l'anticorps primaire ont été optimisés.

Pour la détection de *N. caninum*, un antisérum polyclonal de lapin infecté par *N. caninum* a été utilisé à une dilution de 1 : 500 pendant 30 minutes.

Un échantillon de tissu cardiaque infecté par *N. caninum* a été inclut dans le protocole expérimental.

Un total de 06 avortons bovins a été inclus dans cette étude. Des échantillons provenant du foie, du cœur et de la partie gauche ou droite du cerveau ont été fixés dans une solution saline tamponnée au formol à 10% (Wouda *et al.*, 1997).

Un échantillon de sérum maternel a été analysé, avec les échantillons de tissus fœtaux.

Tests sérologiques pour la détection des anticorps dirigés contre Brucella abortus : Épreuve à l'antigène tamponné (EAT) = Test Rose Bengale

L'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus* (souche 99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol (0,5%), récupérée par centrifugation, diluée en tampon acide puis colorée par le Rose Bengale.

Pour chaque 35 ml de cette suspension, on a rajouté 1 ml de Rose Bengale à 1 % dans de l'eau distillée ; le mélange est agité pendant deux heures à température ambiante. Ce mélange est ensuite filtré et centrifugé pour recueillir les cellules colorées, remises en suspension au taux de 1g de cellules pour 7 ml de diluant (hydroxyde sodique, phénol, acide lactique). La couleur de cette suspension doit être rose intense, et le surnageant doit être sans colorant. La suspension est de nouveau filtrée à plusieurs reprises, puis conservée à l'obscurité et au frais.

Chaque sérum bovin à analyser a été mélangé avec l'antigène à volumes égaux, et après 4 minutes de contact, la présence d'anticorps se traduit par la formation d'agglutinants visibles à l'œil nu. S'il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le mélange reste homogène.

Le mode opératoire est le suivant :

- placer l'antigène et les sérums à température ambiante (18-23°C) 30 à 60 minutes avant le début du test ;
- sur une plaque, déposer 30 µL de chacun des sérums à tester ;
- agiter doucement le flacon d'antigène ;
- déposer 30 µL d'antigène coloré à côté de chacun des sérums ;
- mélanger soigneusement l'antigène et le sérum ;
- agiter la plaque pendant quatre minutes exactement et lire immédiatement.

Le témoin positif et négatif nous a été remis par le laboratoire central vétérinaire d'El Harrach. Pour l'interprétation, une absence d'agglutination signifie qu'il n'y a pas d'anticorps dans le sérum, tandis que l'existence d'une agglutination, aussi minime soit-elle, signale la présence d'anticorps anti-*Brucella*.

Nous avons utilisé derrière la technique de fixation du complément pour confirmer nos sérums positifs ou douteux.

Fixation du Complément

La fixation du complément peut être réalisée à chaud (37°C pendant 30 minutes) ou à froid (4°C pendant 14-18 heures), avec des caractéristiques légèrement différentes, à adapter à la qualité des sérums testés.

Le protocole est le suivant :

- Des dilutions successives du sérum inactivé sont mises en présence de concentrations constantes d'antigène brucellique ainsi que de complément titré, puis le tout est mis à incuber, au chaud ou au froid.
- Les anticorps éventuellement présents dans le sérum analysé forment des complexes antigène/anticorps, propres à fixer le complément (s'il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le complément reste libre).
- La présence de complément libre est mise en évidence par addition d'un complexe hémolytique : globules rouges de mouton + sérum hémolytique correspondant.

Si des anticorps spécifiques de *Brucella abortus* sont présents, il y a absence d'hémolyse, tandis qu'en l'absence de ces anticorps, une hémolyse se produit.

Il est indispensable de mettre en place différents témoins pour pouvoir interpréter les réactions : un témoin sérum, un témoin antigène, un témoin complément et un témoin globules rouges.

L'interprétation des résultats est standardisée : il existe un système d'unité pour la lecture, basé sur le sérum standard de l'Office International des Epizooties, qui contient 1000 ICFTU (International Complement Fixation Test Units) par millilitre. Chaque laboratoire pratiquant ce test doit donc être agréé pour que ses résultats soient interprétables suivant les normes

internationales. Ainsi, les sérums donnant un titre équivalent à 20 ICFTU/ml ou plus sont considérés comme positifs.

Tests sérologiques pour mettre en évidence des autres agents infectieux abortifs

Pour les autres agents infectieux abortifs (*Neospora caninum*, BVD, BHV1 et BHV4, *Leptospira*, *Chlamydophila abortus* et *Coxiella burnetii*). Des kits sérologiques Elisa seront commandés juste après la réception du lecteur Elisa dans le but de rechercher les anticorps dirigés contre tous ces agents infectieux.

Test sérologique pour mettre en évidence les anticorps dirigés contre Neospora caninum:

Nous avons utilisé la trousse ELISA *Neospora caninum*BIO-X. Il s'agit d'un ELISA de type sandwich.

Les puits sont recouverts d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine p38 de *N. caninum*. Les colonnes impaires (1, 3, 5, 7, 9, 11) des microplaques ont été incubées en présence d'un sonicat de tachyzoïtes de *N. caninum* tandis que les colonnes paires (2, 4, 6, 8, 10, 12) renferment un témoin antigénique. Les sérums sanguins sont dilués dans le tampon de dilution. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique des immunoglobulines de chien couplé à la peroxydase. A l'issue de la seconde incubation, on ajoute le substrat de l'enzyme, le peroxyde d'hydrogène, ainsi que le chromogène, la tetraméthyl benzidine (TMB). En cas de présence d'anticorps spécifiques de *N. caninum* dans le sérum, le conjugué reste fixé dans la cupule et l'enzyme transforme le chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en anticorps spécifiques. Le signal enregistré sur la cupule négative est retranché du signal de la cupule positive.

Pour plus de détails voir : http://www.biox.com/UDTData/13/UDT_FrenchInsert/BIO%20K%20192.pdf.

Test sérologique pour mettre en évidence les anticorps dirigés les virus IBR/IPV, BVDV, BHV-4

Nous avons utilisé la trousse Biox pour le diagnostic sérologique chez le bovin des virus IBR/IPV, BVDV, BHV-4 par la méthode ELISA.

La trousse ELISA Avortement de Bio-X ne reprend, à l'heure actuelle, que les 3 valences virales, c'est-à-dire le virus de la diarrhée bovine (BVDV), le virus BHV-4 et le virus de la rhino-trachéite infectieuse (IBR). Cette trousse vise à mettre en évidence l'existence de séroconversions vis-à-vis des 3 virus cités, chez le bétail adulte, c'est-à-dire chez la bête qui a avorté mais surtout chez les autres animaux du troupeau, idéalement 10% du cheptel ou de

l'étable. En effet, au moment où l'avortement survient, le titre sérique de la mère a très souvent déjà atteint son maximum et il n'est dès lors plus possible de mettre en évidence de séroconversion. Il est donc préférable de tester les autres animaux du troupeau de manière à vérifier que l'infection suspectée est toujours bien active au sein du troupeau. Si plusieurs animaux font une séroconversion franche vis-à-vis d'un des trois agents pathogènes de la trousse, on pourra attribuer la cause de l'avortement à cet agent. Pour plus de détails voir :<http://www.biox.com/UDTData/13/UDTFrenchInsert/BIO%20K%20072.pdf>.

5- Analyses moléculaires

Extraction d'ADN génomique

Un nombre de 360 matières fécales de vaches ont été analysées comprenant 278 vaches n'ayant jamais avorté (vaches contrôle) et 82 vaches ayant avorté (vaches cas).

Les fèces ont été collectés directement par voie rectale. Pour l'isolement de *Salmonella*, 1 g de fèces était ajouté à 10 ml de milieu Rappaport-Vassiliadis (Bouillon Rappaport-Vassiliadis CM0669, Oxoid, France). Les tubes ont été incubés à 42°C pendant 24 h. Une méthode d'extraction d'ADN génomique bactérien a été par la suite réalisée.

Un millilitre de culture positive a été centrifugé à 10 000 g pendant 3 min puis lavé dans 500 µl d'eau stérile pure en centrifugeant à 12 000 x g pendant 5 Mn puis portées à ébullition pendant 10 Mn. Les tubes ont été ensuite centrifugés à 12 000 x g pendant 5 Mn et le surnageant a été transféré dans un tube propre et conservé à – 20°C jusqu'à analyse.

L'ADN a été extrait ensuite du surnageant et déterminé en utilisant un spectrophotomètre Nano Drop 2000 (Thermo Fisher- USA)

La présence de *Salmonella dublin* a été déterminée par la méthode PCR comme décrite par Zhai et collaborateurs (2014).

PCR classique pour la détection de Salmonella dublin

Nous avons sélectionné des fragments d'ADN de *S. dublin* ayant une faible homologie avec des non-*Salmonella* et une plus grande homologie avec *S. dublin* (Kim *et al.*, 2006).

Des fragments cibles spécifiques à *Salmonella dublin* ont été inclus simultanément tels les gènes SeD_A1118 et SeD_A2283 conformément aux travaux de Zhai et collaborateurs (2014). Ces fragments d'ADN sélectionnés ont été considérés comme des cibles spécifiques pour la détection de *S. dublin*. Le gène *invA* spécifique des salmonelles a également été rajouter pour renforcer la spécificité de la réaction PCR.

Dans ce système PCR, un mélange de 3 paires de primers a été utilisé pour la détection de *Salmonella dublin* afin d'augmenter la précision de l'identification. Les primers sont les

suivants : 139-141 pour la détection du gène *invA* a été utilisé comme contrôle ; le pDm10 pour le gène *SeD_A1118* et le pDm17 pour le fragment *SeD_A2283*.

Le test PCR contient des primers spécifiques pDm10 et pDm17 pour la détection de *S. dublin*. La réaction de PCR était de 25µl contenant le tampon 10× [Tris-HCl 75 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, Tween-20 0.01%], du MgCl₂ 3.2 mM, un mélange de Dntp 0.1 mM, Taq polymérase 0.12 U, chaque primer (pDm10, pDm17 et 139-141) 0.56 mM et 5µl d'échantillon.

La réaction de PCR consiste à une étape de dénaturation initiale de 95 °C pour 5 Mn, 35 cycles de 95°C POUR 30 s, 60°C pour 30 s, 72 °C pour 45 s et une étape d'extension finale de 72°C pour 10 Mn

Les produits de la réaction de PCR ont été observés sous lumière ultraviolette après un passage sur des gels d'agarose à 2% (selon la taille des fragments) en tampon TAE 1 X [Tris-acétate 40 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM] sous un voltage constant de 100 V pendant 45 à 60 min dans un appareil d'électrophorèse de type Mini-**Sub Cell** GT ou **Sub Cell** GT de Bio-rad.

II.5. Analyses statistiques

Les prévalences calculées ont été estimées à 95% d'intervalle de confiance. Les différences statistiques dans les proportions ont été comparées en utilisant le test du Chi² (Yates corrected) ou dans certains cas en utilisant le test de Fisher exact. Les différences observées ont été considérées comme significatives quand la valeur de *P* était inférieure à 0,05. Les analyses statistiques ont été menées grâce aux logiciels consultés en ligne: [http://www.Outil.decalculdeKhicarré\(Chicarré%3bChideuxouX2\).html](http://www.Outil.decalculdeKhicarré(Chicarré%3bChideuxouX2).html) et [http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module= tests/fisher](http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests/fisher), pour le calcul de Chi² et de Fisher exact respectivement.

- Les prévalences et l'intervalle de confiance (IC) ont été calculés selon les formules suivantes (Toma *et al.*,2001) :

$(P) = n/N \times 100$ avec *n* = nombre de prélèvements positifs et *N*= nombre total des prélèvements analysés.

$(IC) = P \pm 1.96 \sqrt{(1-p) / N}$, avec *p* = prévalence observée dans l'échantillon.

Dans l'enquête cas-témoin, 3 trois paramètres ont été calculés.

Odds ratio (OR)

La force d'association entre la séropositivité aux pathogènes et les avortements a été mesurée par le biais du test du Khi-deux de Pearson (χ^2) et de l'odds ratio (OR) avec calcul d'un intervalle de confiance de 95% (IC). En se basant sur un risque de première espèce α égal à 0,05. La variable est considérée comme facteur de risque lorsque l'OR et la valeur de *p* (χ^2) sont significatifs (OR > 1 et valeur de *p* < 0,05) (Toma *et al.*,2001).

L'interprétation de l'odds ratio (OR) se fait de la façon suivante :

- OR = 1, $p(\chi^2) > 0.05$ ou [IC95%] incluant la valeur 1 : absence de relation entre le facteur de risque et la maladie.
- OR > 1, $p(\chi^2) < 0.05$ ou [IC95%] excluant la valeur 1 : risque accru de maladie (facteur de risque).
- OR < 1, $p(\chi^2) < 0.05$ ou [IC95%] excluant la valeur 1 : risque réduit de maladie (facteur protecteur).

Fraction attribuable chez les exposés ou fraction étiologique de risque

La fraction attribuable chez les exposés permet d'exprimer la relation entre l'exposition et la maladie par un indice qui fournit un renseignement important sur la prévention.

La fraction attribuable chez les exposés AFest, par définition, la proportion de cas attribuable à l'exposition parmi les sujets exposés (Rockhill *et al.*, 1998), autrement dit, c'est la proportion des cas exposés qui aurait été épargnée si l'exposition n'était pas présente.

Par exemple, dans notre étude, il s'agit de la proportion parmi tous les cas d'avortements attribués aux pathogènes parmi les cas d'avortements séropositifs vis-à-vis de ces agents, ou bien encore on peut expliquer par la proportion des cas d'avortements exposés à ces agents abortifs qui aurait été épargnée si cette exposition n'était pas présente.

Cet indice est calculé par la loi statistique suivante (Martin *et al.*, 1987 ; Benichou, 1991 ; Garcia-Vazquez, 2005) : **AF = (OR-1) / OR**

Ainsi, à partir de la fraction attribuable chez les exposés **AF**, nous pouvons estimer le nombre (**Ne**) de cas attribuable à l'exposition parmi les cas exposés à travers la formule suivante (Rockhill *et al.*, 1998) :

Ne = AF × ne, soit *ne* le nombre de cas exposés.

Fraction attribuable dans la population ou fraction étiologique de risque dans la population

La fraction attribuable dans la population (PAF) c'est la proportion parmi tous les cas dans la population cible, de ceux que l'on peut attribuer à l'exposition (Rockhill *et al.*, 1998), expliqué encore par la proportion de tous les cas qui aurait été prévenus si l'exposition n'était pas présente. Elle mesure l'impact global du facteur de risque dans la population en tenant compte de la proportion des individus exposés.

Dans notre étude, c'est la proportion parmi tous les cas d'avortement attribuée aux pathogènes ou encore aux coïnfections existantes. On peut expliquer aussi par la proportion de tous les cas d'avortement qui aurait été épargnée si ces pathogènes n'étaient pas présents.

Le PAF est mesuré comme suit (Benichou, 1991 ; Smith, R., 1995 ; Garcia-Vazquez *et al.*, 2005) : **PAF = AF * proportion des exposés parmi les cas.**

Ainsi et de la même façon que pour la fraction attribuable chez les exposés AF, nous pouvons estimer le nombre (N_p) de cas attribuable à l'exposition parmi le nombre de tous les cas observés à partir de la fraction attribuable dans la population (PAF) (Rockhill *et al.*, 1998).

$N_p = PAF \times np$, soit np le nombre de cas total.

La fraction étiologique du risque dans la population est un paramètre fondamental dans les enquêtes épidémiologiques cas-témoin car elle permet de quantifier la proportion de cas évitables si on supprime l'exposition.

- La fraction attribuable dans la population de plusieurs facteurs est calculée de la façon suivante (Steenland et Armstrong, 2006 ; Sanhueza *et al.*, 2011) :

$PAF_{total} = 1 - [(1 - P_{AF1}) \times (1 - P_{AF2}) \times (1 - P_{AF3})]$.

III. RÉSULTATS

I. ÉTUDE HISTOLOGIQUE

Afin d'identifier des lésions d'origine infectieuse au sein du groupe de vaches ayant avorté, une analyse histologique systématique des 6 avortons a été menée.

Le cerveau, le cœur, le foie et la rate ont été analysés, aucun signe clinique n'a été évoqué chez les vaches ayant avorté. Les informations concernant l'âge des mères et des fœtus sont résumées dans le Tableau 5 ci dessous.

Tableau 5 : âge moyen et intervalle de confiance à 95 % des fœtus et vaches mères.

Âge moyen des vaches mères en mois (95% CI)	Âge moyen des foetus en mois (95% CI)
51,1 (46,9 – 55,2)	6,7 (6,5 – 6,9)

Des lésions compatibles avec une infection à *N. caninum* ont été observées chez 1 des 6 fœtus (16,66%) au niveau du cœur, du foie et du cerveau. Chez ce fœtus, la mère était séropositive. Des lésions évocatrices de néosporose, consistant en une encéphalite non suppurée multifocale caractérisée par une coiffe périvasculaire et une gliose multifocale ont été observées chez le fœtus. De plus, des foyers nécrotiques entourés par un bord de cellules inflammatoires microgliales et mononucléées ont été observés chez le même fœtus (Figure 4).

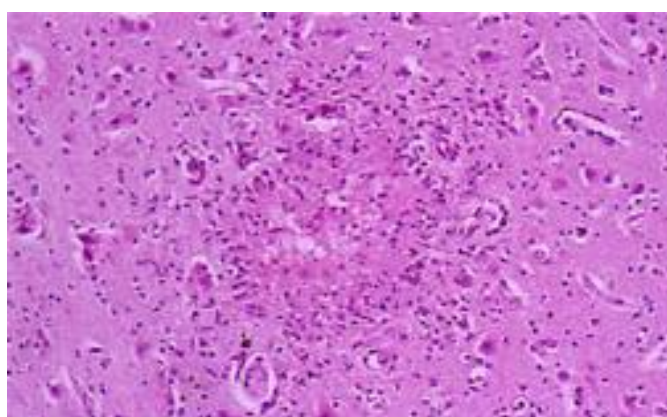


Figure 4 : Encéphalite nécrosante focale (coloration à l'hématoxyline et l'éosine, x 100)

Sur un total de 10 sections réalisées sur le cerveau du fœtus présentant des lésions évocatrices de néosporose, 4 (40%) ont été considérées positives. Une régression logistique exacte était

incapable de montrer une localisation préférentielle des lésions dans les trois parties du cerveau examinées ($P > 0,12$).

Une myocardite focale ou diffuse a été observée chez le même fœtus. Cependant, les tissus cardiaques étaient souvent sévèrement autolysés, ce qui entravait l'examen approprié. Dans le foie, des infiltrats inflammatoires mononucléaires étaient présents dans la région portale chez le même fœtus. Une nécrose hépato-cellulaire a été également observée (Figure 5).

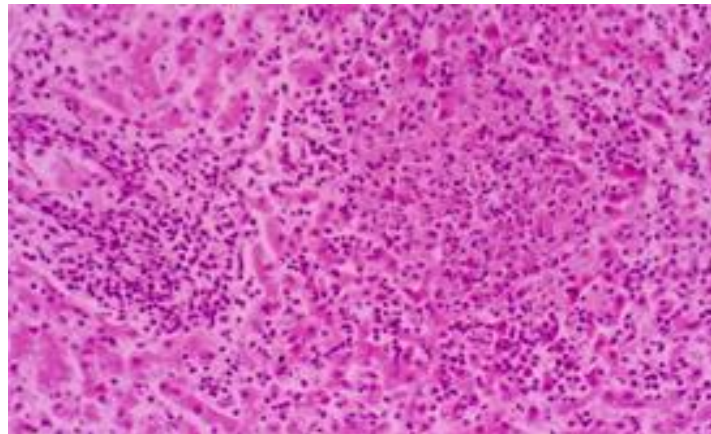


Figure 5 : Zone focale de la nécrose hépatocellulaire (coloration à l'hémalun-éosine, x 100)

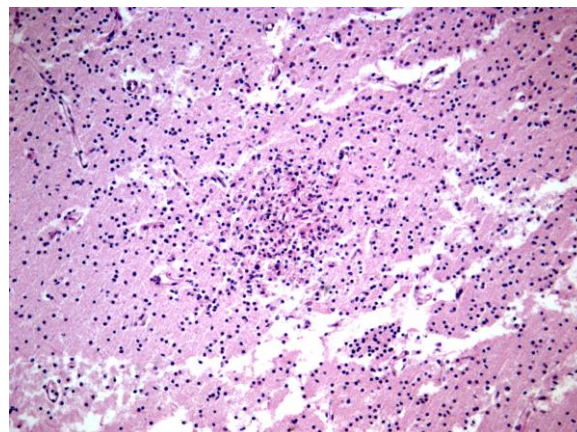


Figure 6 : foyer nécrotique central entouré par des cellules micro-gliales dans le cerveau du fœtus positif (coloration à l'hémalun-éosine, x 400)

Dans le cerveau, les kystes de *Neospora caninum*, sans lésions associées, ont été identifiés sur le même fœtus. Des tachyzoïtes, isolés ou en grappes, ont été identifiés dans le cerveau du même fœtus, parfois associés à des microglioses et de la nécrose.

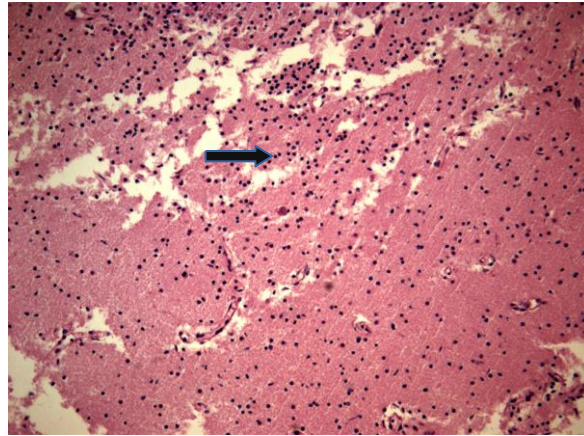


Figure 7 : kyste microscopique de *Neospora caninum* dans le cerveau du fœtus bovin. On note l'absence d'inflammation. (×400) Amino Ethyl Carbazole avec antisérum à *N. caninum*.

II. ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Tous les échantillons de tissus testés étaient négatifs pour *T. gondii*. Le fœtus qui est né de vache séropositive présentant des lésions microscopiques compatibles avec la néosporose, a été examiné et confirmé par IHC. *N. caninum* a été identifié le plus souvent dans le cerveau. Les antigènes de *N. caninum* étaient généralement situés dans les foyers d'encéphalite, indépendamment de la présence de nécrose (Figure 8).

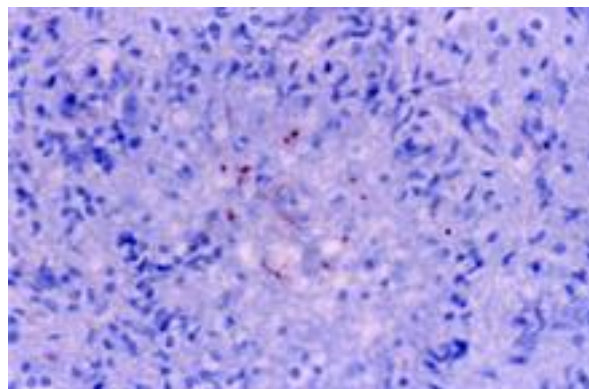


Figure 8 : Grappe de tachyzoïtes dans un foyer de nécrose du cerveau du fœtus avorté (200X). Amino Ethyl Carbazole avec antisérum à *N. caninum*

Dans le myocarde, les tachyzoïtes ont été identifiés, principalement à l'intérieur des fibres du myocarde, où ont été associés à des infiltrats ou à des zones de nécrose, ou les deux. Dans le foie, les tachyzoïtes, isolés ou en grappes, ont été également identifiés (Figure 9).

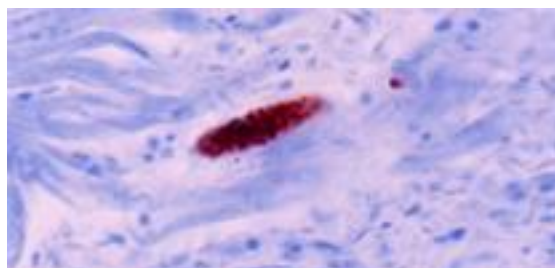


Figure 9 : amas de tachyzoïtes de *N. caninum* dans le cœur du fœtus bovin (×400) Amino Ethyl Carbazole avec antisérum à *N. caninum*

III. ANALYSE MOLÉCULAIRE POUR LA DÉTECTION DE *Salmonella dublin*

Un échantillon de 360 matières fécales de vaches (278 contrôles et 82 cas) a été analysé par le système PCR classique pour la détection de *Salmonella dublin*. Un total de 5 vaches soit une prévalence de 1.39 % s'est montré positif (Figure 10).

Le résultat après électrophorèse sur gel d'agarose a révélé trois bandes lumineuses cibles ayant une taille de 284 pb, 378 pb et 463 pb et qui sont spécifiques à *S. dublin*. Aucune autre bande non spécifique n'a été observée.

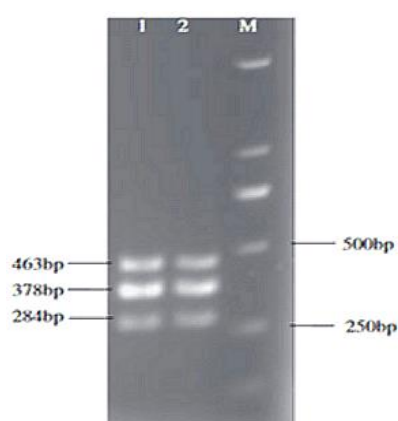


Figure 10 : Gel d'agarose montrant le résultat positif par la technique PCR pour la détection de *S. dublin*. 1 et 2: *S. dublin*, M: DL2000. Les séquences cibles SeD_A1118, SeD_A2283 et invA, produisant des amplicons de 463 pb, 378 pb et 284 pb, respectivement.

IV. ÉPIDÉMIOLOGIE DESCRIPTIVE

La prévalence d'un pathogène correspond au pourcentage d'individus positifs parmi les individus analysés. La prévalence des différents pathogènes a été évaluée chez 360 vaches (Tableau 6). Celle-ci variait de 0% pour *T. foetus* à 15% pour *N. caninum*. La prévalence globale c'est-à-dire la proportion de vaches avec au moins un pathogène présent était de 80 vaches sur 360 soit 22,2%.

Tableau 6 : Prévalence des différents pathogènes étudiés.

Pathogène	Positif	Négatif	Prévalence (%)	IC 95%
<i>N. caninum</i>	54	306	15,00	11,31–18,69
BoHV1	2	358	0,55	0–1,31
BoHV4	13	347	3,61	1,68–5,54
BVD virus	5	355	1,39	0,18–2,6
<i>B. abortus</i>	11	349	3,06	1,28–4,84
<i>S. dublin</i>	5	355	1,39	0,18–2,6
<i>L. hardjo</i>	14	346	3,89	1,89–5,89
<i>C. burnetii</i>	6	354	1,67	0,35–2,99
<i>C. abortus</i>	3	357	0,83	0–1,77
<i>T. foetus</i>	0	360	0,00	Non déterminé
Au moins un pathogène	80	280	22,22	17,9–26,5

Si on considère les 80 vaches positives pour au moins un pathogène, 55 d'entre elles (68,75%) n'étaient positive que pour un seul des pathogènes étudiés alors que 25 vaches (31,25%) étaient positives pour 2 ou 3 pathogènes (tableau7). Huit vaches (32%) étaient positives pour 3 pathogènes et 17 vaches (68%) étaient positives pour 2 pathogènes. La combinaison de pathogène la plus fréquente était l'association de *N. caninum* avec le BoHV4 avec 6 occurrences devant l'association entre *N. caninum* et *L. interrogans* avec 5 occurrences. Parmi les vaches présentant des infections multiples, 13 étaient issues de fermes cas et 12 étaient issus de fermes témoins.

Tableau 7 : Les vaches présentant une infection multiple.

Vache	Cas	NC	BoHV1	BoHV4	BVD	BA	SD	LI	CA	CB	Total
1	Non	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3
2	Oui	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3
3	Oui	1	0	1	0	0	1	0	0	0	3
4	Oui	1	0	1	0	0	0	1	0	0	3
5	Oui	1	0	1	0	1	0	0	0	0	3
6	Oui	0	0	0	1	0	0	1	0	1	3
7	Oui	0	0	0	0	1	0	1	0	1	3
8	Oui	0	0	0	1	0	1	1	0	0	3
9	Non	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
10	Non	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
11	Non	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
12	Non	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
13	Non	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
14	Non	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
15	Oui	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
16	Non	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
17	Non	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
18	Oui	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
19	Oui	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
20	Non	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
21	Non	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
22	Non	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2
23	Oui	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
24	Oui	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2
25	Oui	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
Total		16	1	9	5	9	4	9	2	3	58

NC–*Neospora caninum* ; BA–*Brucella abortus* ; SD *Salmonella dublin*;
LI *Leptospira interrogans*; CA–*Chlamydophila abortus*; CB–*Coxiella burnetii*

V. ÉPIDÉMIOLOGIE EXPLICATIVE

Après avoir décrit la prévalence des différents pathogènes abortifs dans l'échantillon de vaches étudiées, nous avons voulu dans un second temps analyser si ces pathogènes pouvaient être associés aux avortements chez la vache.

Pour ce faire, une étude cas-témoin a été menée. Les vaches ayant déjà avorté sont les vaches cas et les vaches n'ayant pas avorté sont les vaches témoins. Sur les 360 vaches, 82 ont déjà avorté et sont donc considérées comme vaches cas et 278 n'avaient jamais avorté et étaient considérées comme des vaches témoins. Dans chaque groupe (cas ou témoin), on détermine le nombre d'individus positifs et négatifs, ceci permet de calculer des cotes et un rapport de cotes (Odds ratio). Si le rapport des cotes est significativement différent de 1, il y a un effet de l'exposition au pathogène sur les avortements. Si l'odds ratio (OR) est significativement inférieur à 1, l'effet est protecteur alors que si l'OR est significativement supérieur à 1, le pathogène est un facteur de risque d'apparition d'avortements chez la vache. Parmi les 80 vaches positives pour au moins un pathogène, 44 (55%) étaient des vaches témoins et 36 (45%) étaient des vaches cas. Le tableau 8 résume les résultats de l'étude cas-témoin par pathogène spécifique mais aussi quel que soit le pathogène impliqué.

Si on considère les OR, l'exposition à *N. caninum*, BoHV4, BVD, *B. abortus*, *Salmonella dublin*, *L. interrogans hardjo*, *C. burnetii* ainsi qu'à au moins un des pathogènes étudiés est un risque d'avortement. Par contre, l'exposition à BoHV1, *C. abortus* ne semble pas être un facteur de risque d'avortement chez les vaches analysées.

Pour les pathogènes, qui ont un OR significativement supérieur à 1, on peut calculer d'autres paramètres. Comme la fraction attribuable à l'exposition qui correspond à la fraction de vaches exposées au pathogène qui risque d'avorter. Ce paramètre est d'autant plus important que l'OR est important. Ainsi, l'EAF varie de 60,9% pour *N. caninum* à 93% pour BVD et *Salmonella dublin*.

D'autre part, la fraction attribuable de la population (PAF) qui est la proportion des avortements dus à un des pathogènes étudiés n'est que de 33,4% et donc si on évitait tout contact avec un de ces pathogènes, le pourcentage d'avortement ne diminuerait que de cette proportion. Si on regarde les pathogènes spécifiques, le PAF varie de 4,2% pour *C. burnetii* à 15,6% pour *N. caninum*. En d'autres termes, l'absence d'exposition à *N. caninum* réduirait les avortements chez les vaches de 15,6%.

Enfin, un dernier indicateur étudié est la probabilité d'avorter si la vache est en contact avec le pathogène (suivant le théorème de Bayes). Elle varie de 0,39 pour *N. caninum* à 0,8 pour le

BVD. Ceci témoigne du fait que l'exposition à *N. caninum* conduit moins facilement à l'avortement que le contact avec le BVD.

Tableau 8 : Analyse de la relation entre le contact avec un pathogène et l'apparition d'un avortement chez la vache : étude cas-témoin.

Pathogène	Statut	+	-	Total	Taux d'exposition	OR	IC 95%	p	EAF	PAF	P (A/P)
<i>N. caninum</i>	Cas	21	61	82	25,6%	2,56	1,38–4,73	<0,01	60,9%	15,6%	0,39
	Témoin	33	245	278	11,9%						
BoHV1	Cas	0	82	82	0,0%	0,67*	0,03–14,1	0,8	ND	ND	0,0
	Témoin	2	276	278	0,7%						
BoHV4	Cas	9	73	82	11,0%	8,45	2,53–28,2	<0,01	88,2%	9,7%	0,69
	Témoin	4	274	278	1,4%						
BVD	Cas	4	78	82	4,9%	14,21	1,57–128,93	<0,05	93,0%	4,5%	0,8
	Témoin	1	277	278	0,4%						
<i>B. abortus</i>	Cas	6	76	82	7,3%	4,31	1,28–14,51	<0,05	76,8%	5,6%	0,55
	Témoin	5	273	278	1,8%						
<i>S. dublin</i>	Cas	4	78	82	4,9%	14,21	1,57–128,93	<0,05	93,0%	4,5%	0,7
	Témoin	1	277	278	0,4%						
<i>L. hardjo</i>	Cas	10	72	82	12,2%	9,44	2,88–30,99	<0,01	89,4%	10,8%	0,76
	Témoin	4	272	276	1,4%						
<i>C. abortus</i>	Cas	0	82	82	0,0%	0,48*	0,02–9,33	0,63	ND	ND	0,0
	Témoin	3	275	278	1,1%						
<i>C. burnetii</i>	Cas	4	78	82	4,9%	7,08	1,27–39,36	<0,05	85,9%	4,2%	0,67
	Témoin	2	276	278	0,7%						
Au moins un pathogène	Cas	36	46	82	43,9%	4,16	2,42–7,16	<0,01	76%	33,4%	0,45
	Témoin	44	234	278	15,8%						

*: L'OR est normalement infini en raison de la présence de 0 échantillons négatifs dans le groupe cas. Dans cette situation, on ajoute 0,5 à chaque valeur pour permettre de calculer un OR.

Expose attributable fraction = EAF = (OR-1) / OR

Population attributable fraction = PAF = $Po(OR-1) / (1 + Po(OR-1))$

Po = nombre de vaches exposées pour les vaches témoins / nombre de vaches témoins.

$P(A/P)$ = probabilité d'avortement (A) si le pathogène est présent (P) = $p(A \cap P) / P(P)$

ND – non déterminé

IV. Discussion

L'avortement chez la vache reste un souci majeur dans les fermes de vaches laitières avec des pertes économiques importantes. L'identification des causes d'avortement pourrait donc permettre de réduire l'impact de cette pathologie. Ces causes peuvent être divisées en causes infectieuses et non infectieuses. Même si les causes infectieuses semblent être les plus prédominantes, l'identification du pathogène impliqué est souvent difficile en raison des différents pathogènes qui peuvent être impliqués et des méthodes de diagnostic qui ne sont pas toujours optimales. De plus, le diagnostic ne peut pas toujours être pratiqué rapidement sur un avorton ce qui permet aux tissus de s'altérer et d'être contaminés après l'avortement (Anderson, 2007).

Ce travail s'est concentré sur différentes causes infectieuses d'avortement que sont les parasites, les bactéries ou les virus.

En ce qui concerne les parasites, nous avons étudié *T. fetus* et *N. caninum*. Pour ce qui est de notre étude, aucun prélèvement ne s'est révélé positif pour *T. fetus* par PCR. Ceci n'est pas en accord avec d'autres études, comme par exemple, une étude similaire menée au Brésil qui faisait état de 33.4% de prélèvements positifs (Oliveira *et al.*, 2015). Sur base de l'échantillon étudié, il ne semble pas que *T. fetus* soit très présent en Algérie et que donc ce soit une cause importante d'avortement chez le bovin.

N. caninum est considéré comme une cause majeure d'avortement chez le bovin et ce à travers le monde (Almería et López-Gatius, 2013). Une étude précédente réalisée en Algérie a montré que la prévalence en IFAT de *N. caninum* chez le bovin était de 19,6% (Ghalmi *et al.*, 2011). Cependant, il a également été montré que pour la détection d'anticorps anti-*N. caninum* sur des sérums bovins, le nombre de positifs était moindre par ELISA que par IFAT (Ghalmi *et al.*, 2014). Par conséquent, nos résultats (15% de prévalence) étaient compatibles avec les résultats des études précédentes. De façon intéressante, une étude récente menée au Maroc voisin (Lucchese *et al.*, 2016) indique que la prévalence de *N. caninum* chez le bovin n'était que de 8.52% (IC 95% 4,4%-12,6%) ce qui est significativement plus faible ($p < 0.05$) qu'en Algérie dans notre étude et dans les études précédentes (Ghalmi *et al.*, 2011). D'autre part, non seulement *N. caninum* est présent chez le bovin en Algérie mais c'est aussi une cause d'avortement chez la vache algérienne (Ghalmi *et al.*, 2011). Cette étude vient confirmer les résultats précédents avec un OR calculé de 2,56 qui était significativement supérieur à 1. Une étude similaire en Nouvelle Zélande a montré une association significative entre la présence de *N. caninum* et les avortements chez le bovin (OR=3,36) mais avec un risque attribuable dans

la population de seulement 3% (Sanhueza *et al.*, 2013). La proportion d'avortements dus à *N. caninum* est donc faible en Nouvelle Zélande alors que notre étude a montré que le risque d'avortements attribuables à *N. caninum* en Algérie était de 15,6%. Ceci témoigne du fait que plus d'avortements sont attribuables à ce pathogène en Algérie par rapport à la Nouvelle Zélande. Parmi les 54 vaches positives à *N. caninum*, 16 (29,6%) étaient aussi positives pour un autre pathogène. Parmi ces 16 vaches seules 6 (37,5%) avaient déjà avorté. Ceci montre bien que l'association pathogène avortement n'est pas ni évidente, ni automatique. D'ailleurs, en ce qui concerne *N. caninum*, une étude précédente a montré que la race locale (Brune de l'Atlas) était fortement infectée par *N. caninum* mais sans induire significativement des avortements (Ghalmi *et al.*, 2011). Donc, il semble normal d'observer des vaches positives à *N. caninum* mais qui n'ont pas avorté. Ainsi le risque d'avortement si la vache est exposée à *N. caninum* calculé sur base de l'OR (c'est-à-dire l'EAF) n'est que de 60,9% et cette probabilité chute encore d'avantage si on applique le théorème de Bayes avec une probabilité d'avortement en cas de contact avec *N. caninum* de 39%. Tous ces indicateurs soulignent simplement le fait que le contact avec le pathogène ne suffit pas pour expliquer l'avortement de la vache. En Algérie, c'est notamment lié à la race de la vache (Ghalmi *et al.*, 2011).

En ce qui concerne les bactéries, nous avons analysés : *Brucella abortus*, *Salmonella enterica enterica* sérotype *dublin* (en raccourci *S. dublin*), *Coxiella burnetii*, *Leptospira interrogans* sérotype *hardjo* (*L. hardjo*) et *Chlamydomphila abortus*.

B. abortus est responsable d'une zoonose qui est à déclaration obligatoire. Les autorités algériennes organisent des inspections tous les 6 mois et les animaux positifs sont abattus. Pour cette raison, la séroprévalence observée est logiquement faible (3,06%). Néanmoins, nous avons montré une association significative entre la présence de *B. abortus* et les avortements chez la vache (OR=4,31). Une étude algérienne de 2006 indiquait une prévalence de 26,3% chez les bovins en utilisant la technique d'agglutination au Rose Bengal (Aggad et Boukraa, 2006). Néanmoins, cette étude ne faisait pas le lien avec les avortements. Par conséquent, cette différence importante en prévalence sur ces 10 dernières années doit être principalement due à l'application du plan de surveillance par les autorités vétérinaires.

En comparaison, la prévalence observée était de 33,5% au Maroc (Lucchese *et al.*, 2016), 14% en Ouganda (Miller *et al.*, 2016) ou de 5 à 6 % au Pakistan (Abubakar *et al.*, 2010 ; Ali *et al.*, 2017). Il est à noter que la technique du Rose Bengal quoi que facile à mettre en œuvre peut donner des résultats tant faux positifs que faux négatifs. Pour les faux positifs, un test de

confirmation est requis (Getachew *et al.*, 2016).

Les Salmonelles du sérotype dublin ont été impliquées dans des avortements chez la vache. Il est possible de distinguer le sérotype dublin des autres sérotypes grâce à la PCR (Zhai *et al.*, 2014). La prévalence dans notre étude était de 1,39%. Historiquement parlant, *S. dublin* est un problème principalement dans les pays d'Europe du nord (Danemark et Suède) où elle fait l'objet d'une surveillance étroite (Agren *et al.*, 2016). La prévalence peut être estimée par des tests immuno-enzymatiques sur le lait ou sur le sérum, par culture sur des matières fécales suivie de PCR. Les prévalences observées sont plus basses par PCR et cultures que par sérologie (Nielsen, 2013). La prévalence par PCR observée dans les pays nordiques est de moins d'un pourcent (Nielsen, 2013). Néanmoins, en Algérie *S. dublin* est significativement associée avec l'avortement des bovins (OR=14,21) et la probabilité pour une vache d'avorter si elle est porteuse de ce germe est de 70% ce qui en fait un agent abortif particulièrement efficace. Par conséquent, même si la prévalence est basse le risque d'avortement est élevé. Dans cette étude, la prévalence de *S. dublin* a été obtenue par l'utilisation du système PCR classique qui a montré une grande spécificité et sensibilité dans d'autres travaux ultérieurs (Zhai *et al.*, 2014).

Pour *L. hardjo*, la prévalence observée était de 3,89% ce qui est faible par rapport à la prévalence observée au Maroc (9,09%) (Lucchese *et al.*, 2016). Néanmoins, une association significative a été trouvée entre l'exposition à *L. hardjo* et le fait d'avorter (OR=9,65). La même observation a été faite en Nouvelle Zélande (OR=1,84) (Sanhueza *et al.*, 2013).

Ceci indique que ce pathogène peut être considéré comme une cause d'avortement même si la prévalence est faible. Ainsi, la probabilité d'avoir un avortement combiné à l'exposition à *L. hardjo* est de 76%.

Pour *C. burnetii*, la séroprévalence était de 1,67% parmi l'échantillon de vaches algériennes. Cette séroprévalence est basse par rapport aux 12,3% observés chez des vaches en Espagne (Astobiza *et al.*, 2012) ou aux 33% observés en Chine (El-Mahallawy *et al.*, 2016). Ce pathogène zoonotique est particulièrement virulent chez l'homme où il est classé dans la classe 3 et fait partie des agents potentiels en bioterrorisme. Il faut donc éviter tout contact avec les animaux contaminés. Notre étude a confirmé l'association étroite entre l'exposition à *C. burnetii* et les avortements chez la vache (OR=7,08). La probabilité d'avorter si la vache a été en contact avec le pathogène est de 67%. Mais en raison de sa faible prévalence, le fait d'éviter le contact entre la vache et *C. burnetii* ne réduirait les avortements que de 4,2%.

Enfin, *C. abortus* est considéré comme une cause rare d'avortement chez le bétail. Sa prévalence en Algérie est très faible (0,83%) par rapport à la prévalence observée en Jordanie (19,9%) (Talafha *et al.*, 2012) mais similaire à la prévalence observée en suède (0,4%) (Godin *et al.*, 2008). Dans notre étude, il n'y avait pas d'association entre l'exposition à *C. abortus* et les avortements puisque les 3 individus positifs étaient des témoins.

En ce qui concerne les virus, nous avons analysé : le BVDV et les herpes virus BoHV1 et BoHV4. En ce qui concerne le BVDV la prévalence observée était de 1,39% ce qui est faible par rapport au Maroc où la prévalence récemment rapportée était de 37,71% (Lucchese *et al.*, 2016) mais ce qui est comparable aux prévalences européennes qui varient de 0,6% en Irlande à 1,4% au Danemark (Barrett *et al.*, 2011). Par contre, le BVDV est un problème majeur en Australie avec environ 80% des troupeaux qui sont infectés (Lanyon *et al.*, 2014). Quoi qu'il en soit, il y a une claire association entre l'exposition au BVDV et les avortements avec un OR de 14,21, un risque d'avortement de 93% dans la population exposée si on tient compte de l'OR et une probabilité conditionnelle d'avortement de 80% en cas de contact avec le pathogène selon le théorème de Bayes. Il s'agit donc d'un agent abortif particulièrement efficace. Cependant, en raison de la faible prévalence en Algérie, la diminution des avortements suite à l'absence de contact des vaches avec le BVDV ne serait que de 4,5%.

Nos données sont comparables à celles décrites en Nouvelle Zélande avec un OR de 2,01 et un risque attribuable dans la population de 3,5% (Sanhueza *et al.*, 2013).

En ce qui concerne le BoHV1, l'agent de l'IBR, il a été associé à des avortements dans différents pays mais pas en Algérie car les 2 vaches positives étaient des vaches témoins. Ainsi, la séroprévalence n'était que de 0,55% ce qui contraste avec, par exemple, les 28,78% observés en Turquie (Aslan *et al.*, 2015).

Si on considère le virus BoHV4, la prévalence observée dans notre étude était de 3,61% ce qui est inférieur aux 41,3% observés en Turquie (Aslan *et al.*, 2015) et aux 9,52% observés au Maroc (Lucchese *et al.*, 2016). Le BoHV4 est une cause avérée d'avortement en Belgique (OR=1,81) (Czaplicki et Thiry, 1998). Cette association semble encore plus forte en Algérie avec un OR de 8.45. Le risque d'avortement attribuable au BoHV4 est de 9,7% dans la population bovine algérienne.

Dans la présente étude, l'histologie et l'immunohistochimie ont été appliquées pour le diagnostic d'une éventuelle infection fœtale. Nous nous sommes donc attachés à la collecte et à l'examen d'avortons bovins âgés de 3 à 6 mois, ce qui coïncide avec la période probable des avortements induits par *N. caninum*.

Les organes prélevés étaient, le cerveau, le cœur et le foie, organes les plus fréquemment affectés en cas d'atteinte (Wouda *et al.*, 1997a ; Dubey, 2003 ; Georgieva *et al.*, 2006).

Un avorton sur les six prélevés s'est montré positif à l'histopathologie. Les dix sections du cerveau ont permis de mettre en évidence la présence de lésions compatibles avec l'infection par *N. caninum*. Nous avons noté des lésions consistant en une encéphalite non suppurée multifocale caractérisée par une coiffe périvasculaire et une gliose multifocale. De plus, des foyers nécrotiques entourés par un bord de cellules inflammatoires microgliales et mononucléées ont été observés chez le même fœtus.

Nous avons identifié sur l'une des coupes du cerveau du même avorton une structure ressemblant à un kyste à bradyzoïtes ou un pseudokyste intra-cellulaire rempli de tachyzoïtes. S'il s'agit bien de tachyzoïtes, associés à l'inflammation observée nous pouvons suggérer alors que l'infection était aiguë avec une dose assez élevée de parasites pouvant indiquer une infection primaire de la mère. Une observation similaire a été décrite dans une étude menée aux Pays-Bas (Wouda *et al.*, 1997). Par ailleurs, la présence de lésions relativement modérées démontrées par l'HP chez cet avorton n'exclut pas une infection aiguë avec une charge parasitaire importante. Corbellini et collaborateurs (2002) ont décrit des lésions inflammatoires modérées sur des tissus cérébraux d'un avorton même en présence de nombreux parasites (Corbellini *et al.*, 2002).

Dans le cadre du diagnostic des avortements attribuables à *N. caninum*, l'analyse histopathologique des tissus du fœtus est essentielle car seule l'identification des lésions permet d'établir une relation entre l'avortement et l'intervention du protozoaire (Lindsay et Dubey, 1989 ; Wouda *et al.*, 1997). La plupart des fœtus infectés par *N. caninum* présentent des foyers d'infiltration cellulaire parfois associés à de la nécrose. Ces lésions sont considérées comme étant incompatibles avec la vie fœtale (Barr *et al.*, 1990 ; Wouda *et al.*, 1997). Néanmoins, l'étendue des lésions peut varier considérablement d'un fœtus à l'autre. On ne peut donc pas exclure, chez un avorton présentant des lésions peu disséminées, que la cause de l'avortement soit attribuable à un autre agent abortif.

En pratique, la méthode principale pour diagnostiquer l'infection à *N. caninum* chez l'avorton est l'examen histo-pathologique des tissus fœtaux suivie par l'identification spécifique du parasite dans les lésions tissulaires par IHC (Lindsay et Dubey, 1989b ; Anderson *et al.*, 1991 ; Barr *et al.*, 1991 ; Dubey et Lindsay, 1993 ; Wouda *et al.*, 1997a).

En effet, un diagnostic de certitude d'une infection par *N. caninum* repose sur l'identification du parasite au sein des tissus. L'analyse immunohistochimique réduit les réactions croisées notamment vis-à-vis de *T. gondii* (Dubey et Lindsay, 1996). Cole *et al.* (1993 ; 1994) ont

amélioré cette technique par l'usage d'un anticorps monoclonal spécifique des tachyzoïtes et kystes de *N. caninum*. Cependant, la plupart des laboratoires de recherche emploient un anticorps polyclonal développé chez le lapin immunisé avec des tachyzoïtes issus de la culture cellulaire (Dubey et Lindsay, 1996). Il est donc important de souligner l'aspect disparate des réactifs employés en immunohistochimie. Ceci pourrait expliquer certains résultats divergents entre laboratoires. L'avantage de cette technique repose sur le fait qu'elle permet de lier la présence du parasite aux lésions mises en évidence lors de l'analyse histopathologique. Le nombre de sections réalisées au sein des tissus suspects est en relation directe avec la sensibilité de la technique.

Bien qu'il n'existe pas de lésions pathognomoniques de la néosporose, la lésion la plus caractéristique est l'encéphalite multifocale marquée par de la nécrose et de l'inflammation non suppurative ainsi qu'une myocardite non suppurative. L'hépatite est plus fréquente dans les avortements épidémiques que sporadiques (Barr *et al.*, 1991 ; Wouda *et al.*, 1997a).

Les différentes sections des autres organes de l'avorton (foie et cœur) ont montré une myocardite focale ou diffuse a été observée chez le même fœtus. Cependant, les tissus cardiaques étaient souvent sévèrement autolysés, ce qui entravait l'examen approprié. Dans le foie, des infiltrats inflammatoires mononucléaires étaient présents dans la région portale chez le même fœtus. Une nécrose hépato-cellulaire a été également observée.

Comme indiqué dans la littérature, l'encéphalite multifocale est fortement évocatrice d'une neosporose fœtale en particulier lorsqu'elle est associée à une myocardite (Barr *et al.*, 1990 ; Anderson *et al.*, 1991 ; Nietfeld *et al.*, 1992 ; Otter *et al.*, 1995). L'immunohistochimie a pu mettre en évidence les antigènes de *N. caninum* qui étaient situés dans les foyers d'encéphalite, indépendamment de la présence de nécrose.

Des tachyzoïtes, isolés ou en grappes, ont été identifiés dans le cerveau du même fœtus, parfois associés à des microglioses et de la nécrose. Dans le myocarde, les tachyzoïtes ont été identifiés, principalement à l'intérieur des fibres du myocarde, où ont été associés à des infiltrats ou à des zones de nécrose, ou les deux. Dans le foie, les tachyzoïtes, isolés ou en grappes, ont été également identifiés. Par conséquent, dans notre étude, *N. caninum* pouvait être considéré comme la cause de l'avortement chez l'avorton présentant des lésions histologiques. Rappelons que la mère de l'avorton présentait en IFAT des titres en anticorps spécifiques de *Neospora caninum* alors qu'elle était négative vis à vis des autres agents abortifs recherchés.

Les résultats obtenus sur cet avorton indiquent que les outils diagnostiques tels l'histopathologie et l'immunohistochimie peuvent contribuer à poser le diagnostic d'un avortement à *N. caninum*.

Il est important de connaître les limites d'utilisation de ces tests afin d'optimiser une approche cohérente au sein d'un troupeau infecté. Par ailleurs, les données obtenues sur l'infection fœtale montrent clairement que le diagnostic différentiel de la néosporose doit toujours être considéré dans le cas des avortements sporadique, endémique ou même épidémique dans les élevages bovins en Algérie.

En résumé, dans la littérature, on trouve assez peu de d'études multiples comme nous l'avons réalisé dans cette étude.

Nous avons pointé une étude marocaine (Lucchese *et al.*, 2016) et une étude chinoise (Yang *et al.*, 2012). Le tableau 9 résume les données de ces différentes études.

Tableau 9 : Prévalences observées (%) dans différentes analyses multiples.

Pathogène	Algérie	Maroc	Chine
<i>N. caninum</i>	15%	8,52%	31,3%
<i>L.hardjo</i>	3,89%	9,09%	ND
BoHV4	3,61%	ND	ND
<i>B. abortus</i>	3,06%	33,48%	6,2%
<i>C. burnetii</i>	1,67%	ND	ND
<i>S. dublin</i>	1,39%	ND	ND
BVDV	1,39%	37,71%	7,5%
<i>C. abortus</i>	0,83%	ND	5%
BoHV1	0,55%	50%	36,3%
<i>T. foetus</i>	0%	ND	ND

La comparaison des différentes études multiples indique que les prévalences varient en fonction de l'échantillon et de la région géographique. L'Algérie se différencie des deux autres études au niveau de la faible prévalence en BoHV1. Alors que l'étude marocaine montre une prévalence importante en *B. abortus* ce qui devrait inquiéter nos voisins ainsi que leurs acheteurs potentiels. La Chine montre des prévalences importantes en *N. caninum* et en BoHV1. Ce type d'étude multiple permet notamment d'avoir des informations claires sur la hiérarchie des principales causes d'avortement chez la vache. Ceci devrait nous permettre de mettre en place des mesures prophylactiques.

Ainsi, si on empêche le contact entre les vaches et tous les pathogènes étudiés, la réduction des

avortements attendus serait de 33,4%. Cela signifie donc que la plupart des avortements sont dus, soit à des causes non infectieuses, soit à d'autres pathogènes que ceux étudiés.

Néanmoins, parmi les pathogènes étudiés, *N. caninum* semble être le pathogène qui est la cause infectieuse principale d'avortement chez les bovins en Algérie.

V. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

De nombreux facteurs compliquent le diagnostic étiologique des avortements bovins. Le premier, et le plus décisif de tous, est le manque d'intérêt de l'éleveur. Le facteur financier est prépondérant. Souvent l'éleveur n'a pas suffisamment conscience de l'importance de la lutte contre les avortements pour la rentabilité de son élevage. Le vétérinaire doit donc le convaincre de la nécessité de mettre en œuvre une démarche diagnostique, surtout lors d'avortements répétés. Il existe un grand nombre d'agents potentiellement abortifs, agissant seuls ou en concomitance. Il est évident que tous ne peuvent être recherchés. Le choix des agents à rechercher en priorité est donc particulièrement important.

À travers cette recherche, l'enquête épidémiologique sur les avortements nous a permis d'estimer la prévalence de multiples pathogènes. Le taux le plus important a été obtenu pour *N. caninum* (15%), *L. hardjo* (3,89%), BoHV4 (3,61%), *B. abortus* (3,06%), *C. burnetii* (1,67%), *S. dublin* (1,39%), BVDV (1,39%), *C. abortus* (0,83%), BoHV1 (0,55%), *T. foetus* (0%).

Ce type d'étude multiple permet notamment d'avoir des informations claires sur la hiérarchie des principales causes d'avortement chez la vache. Ceci devrait nous permettre de mettre en place des mesures prophylactiques.

Ainsi, si on empêche le contact entre les vaches et tous les pathogènes étudiés, la réduction des avortements attendus serait de 33,4%. Cela signifie donc que la plupart des avortements sont dus, soit à des causes non infectieuses, soit à d'autres pathogènes que ceux étudiés.

Néanmoins, parmi les pathogènes étudiés, *N. caninum* semble être le pathogène qui est la cause infectieuse principale d'avortement chez les bovins en Algérie.

Au terme de ce travail, il est important de recommander des mesures de lutte appropriées contre ces infections qui consistent à éliminer les maladies et les facteurs de risque favorisant leur dissémination et renforcer les mesures de biosécurité dans les élevages. Ainsi, nous proposons les mesures suivantes :

- un dépistage très large doit être réalisé sur l'ensemble du territoire national pour évaluer la prévalence réelle de ces infections virales en Algérie et l'abattage des animaux séropositifs pour éradiquer ces infections des troupeaux ;
- le maintien d'un troupeau fermé (la limitation du pâturage commun, empêcher le mélange des bovins de troupeaux différents et les élevages mixtes avec les petits ruminants) par des locaux séparés pour réduire le contact avec les animaux contaminés ;

-la restriction du commerce de bovins et la mise en quarantaine des animaux nouvellement achetés pour quelques semaines avant leur introduction au sein du troupeau ;

- l'utilisation de l'insémination artificielle pour limiter la transmission vénérienne de ces infections. Toutefois, une attention particulière sera donnée à l'insémination artificielle, car une contamination peut se produire *via* un sperme contaminé. Les taureaux reproducteurs doivent passer des tests de détection et passer une période de quarantaine avant d'intégrer les centres d'insémination artificielle pour éviter la contamination du troupeau. En outre, les tests à intervalles réguliers des taureaux sont conseillés, pour contrôler la séroconversion et la détection de certains pathogènes abortifs dans la semence, dans les centres d'insémination artificielle ;

- le respect des mesures d'hygiène strictes du matériel d'injection et d'insémination afin d'éviter les risques liés à la contamination par les produits biologiques (vaccins, médicaments, sperme, embryon, colostrum) ou à la contamination indirecte (équipements, vêtements...) ;

De ce fait, un programme de vulgarisation des éleveurs aux différents facteurs de risques et aux mesures de préventions est nécessaire.

Tout avortement doit constituer un élément de suspicion des infections étudiées. La déclaration est obligatoire par les vétérinaires praticiens et étatiques. La femelle suspectée doit être isolée et faire l'objet d'un examen sérologique au niveau des laboratoires de l'Institut National de Médecine Vétérinaire comme pour la brucellose.

La détection précoce des agents infectieux abortifs est indispensable pour permettre l'élimination des animaux infectés, mettre en place très vite les mesures prophylactiques efficaces afin d'éviter une flambée d'avortements susceptibles d'engendrer de lourdes pertes économiques dans l'élevage.

D'où la nécessité de sensibiliser les éleveurs et les vétérinaires praticiens afin de déclarer les avortements.

Cette étude épidémiologique devrait être généralisée dans tout le territoire national afin de pouvoir renseigner sur l'importance de ces infections et d'implanter un système de surveillance et de contrôle efficace.

Ces résultats méritent d'être consolidés en menant des recherches approfondies sur la caractérisation moléculaire à partir d'avortons et de placentas bovins pour confirmer leurs implications dans l'avortement bovin, ainsi que sur l'isolement des souches sévissant en Algérie pour le développement de vaccins efficaces, notamment les vaccins marqués ou délétés qui vont permettre de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés lors de l'élaboration d'un programme d'éradication contre ces infections ultérieurement dans notre pays.

Enfin, il est intéressant de compléter ce travail par d'autres investigations visant d'autres maladies abortives chez le bovin.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Ababneh HS, Ababneh MM, Hananeh WM, Alsheyab FM, Jawasreh KI, Al-Gharaibeh MA, Ababneh MM. Molecular identification of chlamydial cause of abortion in small ruminants in Jordan. *Trop Anim Health Prod.* 2014 Dec;46

Abubakar M., Javed Arshed M., Hussain M., Ehtisham-ul-Haq Ali Q.: Serological evidence of *Brucella abortus* prevalence in Punjab province, Pakistan – a cross-sectional study. *Transbound Emerg Dis* 2010, 57, 443–447.

Aggad H., Boukraa L.: Prevalence of bovine and human brucellosis in western Algeria: comparison of screening tests. *East Mediterr Health J* 2006, 12, 119–128.

Agerholm JS. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. *Acta Vet Scand.* 2013 Feb 18; 55:13.

Akakpo A.J., Teou K.L., Kponmassi T., Zeller I.G., 1994. Epidémiologie des affections abortives des ruminants au Togo : enquête sérologique sur la brucellose, la Chlamydie, la fièvre Q et la fièvre de la Vallée du Rift (125-137). In *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales* Paris : Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext.

Alexander, A.V., et Walker, R.L., et Johnson, B.J., et Charlton, B.R., et Woods, L.W. Bovine abortions attributable to *Listeria ivanovii*: Four cases (1988-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1 mars 1992, Vol. 200, 5, pp. 711-714.

Ali S., Akhter S., Neubauer H., Melzer F., Khan I., Abatih E.N., El-Adawy H., Irfan M., Muhammad A., Akbar M.W., Umar S., Ali Q., Iqbal M.N., Mahmood A., Ahmed H.: Seroprevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in the Potohar Plateau, Pakistan. *BMC Res Notes* 2017, 10, 73–83.

Almería S, López-Gatius F. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. *Res Vet Sci.* 2013 Oct;95(2):303-9

Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198:241-244.

Anderson ML, Barr BC, Conrad PA. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1994 Nov;10(3):439-61

Anderson, M. L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology.* 2007, Vol. 68, 3, pp. 474-486

Andre-Fontaine G. Leptospirosis in domestic animals in France: serological results from 1988a. *Rev Sci Tech.* 2016 Dec;35(3):913-923

Andre-Fontaine G., Michel V, Branger C. Epidemiology of leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop.* 2002 Jan-Apr;54(1):7-10

Andre-Fontaine G., Rodriguez-Gonzalez I., Fillonneau C., Blanchet B., Suard I., Catilina P. [Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive

protection of laboratory rodents]. *Med Mal Infect.* 2004. May;34(5):196-200

André-Fontaine G., et Nicholas D., et Scalzo B., et Keita A., et Nanjiani I. Prévalence sérologique de la leptospirose à *Leptospira* sérovar Hardjo chez les bovins femelles adultes en France en 2004. *Bulletin des GTV.* Septembre, 2010, 55, pp. 67-73

André-Fontaine G., Nicholas D., Scalzo B., Keita A., Nanjings, I. Prévalence sérologique de la leptospirose à *Leptospira* sérovar Hardjo chez les bovins femelles adultes en France en 2004. *Bulletin des GTV.* Septembre, 2010, 55, pp. 67-73.

Archbald, L. F., et Gibson, C. D., et Schultz, R. H., et Fahning M., L., et Zemjanis, R. Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows. *American Journal of Veterinary Research.* 1973, Vol. 34, 9, pp. 1133-1137.

Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Excretion of *Coxiella burnetii* during an experimental infection of pregnant goats with an abortive goat strain CbC1. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun; 990:524-6

Aslan M.E., Azkur A.K., Gazyagci S.: Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV 1, BHV-4, BHV-5 and *Brucella* spp. infections in cattle in Turkey. *J Vet Med Sci* 2015, 77, 1371 -1377

Astobiza I., Ruiz-Fons F., Piñero A., Barandika J.F., Hurtado A., García-Pérez A.L.: Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *J Dairy Sci* 2012, 95, 1632–1638

Ayayi J. A., Assiongbon T-A., Philippe K. 2009. L’impact de la Brucellose sur l’économie et la santé publique en Afrique. *Conf. OIE* 2009, 71-84

Bachy V. Diagnostic de laboratoire des avortements chez les ruminants. *VetAgro Sup*, 2012.46

Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, Daft BM, Kinde H, Conrad PA. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet Pathol* 1990; 27:354-361.

Barrett D.J., More S.J., Graham D.A., O’Flaherty J., Doherty M.L., Gunn H.M.: Consideration on BVD eradication for the Irish livestock industry. *Irish Vet J* 2011, 64, 12–21.

Beaudeau F., Belloc C., Seegers H., Assié S., Sellal E., Joly A. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) antibodies in serum and milk. *Vet Microbiol.* 2001 Jun 22;80(4):329-37

Beaudeau F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet Res.* 2006 Nov-Dec;37(6):827-33

Benaissa MH., Ansel S., Mohamed-Cherif A., Benfodil K., Khelef D, Youngs CR., Kaidi R., Ait-Oudhia K. Seroprevalence and risk factors for *Coxiella burnetii*, the causative agent of

Q fever in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) population in Algeria. *Onderstepoort J Vet Res.* 2017 Aug **31**

Bertrand MP. Aspects of binaural experimentation. *Proc R Soc Med.* 1972. Sep ;65(9) :809-10.

Berri M., Rekiki A., Boumedine KS., Rodolakis A. Simultaneous differential detection of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC Microbiol.* 2009 Jul 1;9:130. doi: 10.1186/1471-2180-9-130

Bharti AR., Nally JE., Ricaldi JN., Matthias MA., Diaz MM., Lovett MA., Levett PN, Gilman RH., Willig MR., Gotuzzo E., Vinetz JM. Peru-United States Leptospirosis Consortium. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003.

Bitsch V. Persistence of infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in Danish cattle herds. *Nord Vet Med.* 1978 Apr-May;30(4-5):178-85

Bonnefoy, J. M. et Noordhuizen, J. Maîtriser le stress thermique chez la vache laitière. *Bulletin des GTV.* n°60 Juillet 2011, pp. 77-85.

Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1996 Aug ;11(3):166-71

Borel, N., et Thoma, R., et Spaeni, P., et Weilenmann, R., et Zimmermann, D.R., et Vaughan, L., et Pospischi, A. Chlamydia-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. *Veterinary Pathology.* 2006, Vol. 43, pp. 702-708.

Bouvet E. [Management and prevention of epidemic tuberculosis at institutional settings]. *Rev Pneumol Clin.* 2002 Dec;58(6 Pt 2): S33-5

Bricout Jeanne. 2014. contribution à l'étude des avortements chez la vache : mise en place d'un protocole en vue du diagnostic étiologique, thèse de Doctorat. UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I (Faculté Médecine - Pharmacie) soutenue le 19 septembre 2014

Brisabois A, Haeghebaert S, Sulem P, Deroudille L, Vanneroy-Adenot E, Bagnis O, Bouvet P, Grimont F, Le Querrec F, Hervy C, Espié E, de Valk H, Vaillant V. Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France, 2001. *Euro Surveill.* 2003 Jul;8(7):151-6

Brock R., Hink MA., Jovin TM. Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence. *Biophys J.* 1998 Nov;75(5):2547-57

Buret, Y. et Marchal, O. Les salmonelloses bovines. *Bulletin des GTV.* Décembre 2006, pp. 101-102.

Campero C.M., Anderson M. L., Walker R.L., Blanchard P.C., Barbano L., Chiu P., Martinez A., Combessies G., Bardon J.C., Cordeviola J. Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. *Journal of Veterinary Medicine B.* 2005, Vol. 52, 138-141

Caron, B., Ménard, M.F. et Simon, F. Les salmonelles bovines : lésions et diagnostic de laboratoire. *Bulletin des GTV*. n°2 Juillet 1997, pp. 53-65.

Carrique-Mas, J. J., et Wilington, J.A., et Papadopoulou, C., et Watson, E.N., et Davies, R.H. Salmonella infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008. *The Veterinary Record*. 9 Octobre 2010, Vol. 167, 15, pp. 560-565.

Chase CC, Chase SK, Fawcett L. Trends in the BVDV serological response in the Upper Midwest. *Biologicals*. 2003 Jun;31(2):145-51

Chastant-Maillard S.: Impact of bovine herpes virus 4 (BoHV-4) on reproduction. *Transbound Emerg Dis* 2015, 62, 245–251.

Chazel M., et Buret Y., et Meunier D., et Calavas D. Le RESSAB, réseau d'épidémiosurveillance des salmonelloses bovines : fonctionnement et résultats. *Bulletin de l'académie vétérinaire de France*. n°4 tome 158 2005, pp. 347-351.

Clothier K, Anderson M. Evaluation of bovine abortion cases and tissue suitability for identification of infectious agents in California diagnostic laboratory cases from 2007 to 2012. *Theriogenology*. 2016 Mar 15;85(5):933-938

Claus RA., Bockmeyer CL., Kentouche K., Sieber MW., Oberle V., Kaufmann R., Deigner HP., Lösche W. Transcriptional regulation of ADAMTS13. *Thromb Haemost*. 2005 Jul;94(1):41-5

Constant, F. et Guillomot, M. Formation et fonctionnement du placenta des bovidés. *Le Point Vétérinaire, numéro spécial reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum*. 2006, pp. 6-11.

Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P. Large offspring or large placenta syndrome ? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod*. 2006 Jul;75(1):122-30

Corbel MJ. The serological response to *Aspergillus fumigatus* antigens in bovine mycotic abortion. *Br Vet J*. 1972 Dec;128(12):73-5

Côté, G. Les effets du selenium sur la santé des bovins de boucherie. Fédération des producteurs de bovins du Québec, juin 2005.

Czaplicki G., Thiry E. An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev Vet Med* 1998, 33, 235–240.

D. E., Parkinson, T. J. et England, G. C.W. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*, 8th edition. Londres: W.B. Saunders, 2001.

Dagnall GJ., Wilsmore AJ. A simple staining method for the identification of chlamydial elementary bodies in the fetal membranes of sheep affected by ovine enzootic abortion. *Vet Microbiol.* 1990 Jan;21(3):233

Davies PA. Bacterial infection in the fetus and newborn. *Arch Dis Child.* 1971 Feb;46(245):1-27

Davison, H. C., Otter, A. et Trees, A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology.* 1999, Vol. 29, 10.

Degraves, F. J., et Kim, T.Y., et Jee, J.B., et Schlapp, T., et Hehnen, H.R., et Kaltenboeck, B. Reinfection with *Chlamydia abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydia*. *Infection and Immunity.* 2538-2545 mai 2004, Vol. 72, 5.

Djelouadji Z, Roux V, Raoult D, Kodjo A, Drancourt M. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms: a reply. *Vet Microbiol.* 2012 Oct 12;159(3-4):544. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.013

Dikken H, Timmer VE, Njenga R. Three new leptospiral serovars from Kenya. *Trop Geogr Med.* 1981 Dec;33(4):343-6

Doceul, V., et Lara, E., et Sailleau, C., et Belbis, G., et Richardson, J., et Bréard, E., et Viarouge, C., et Dominguez, M., et Hendrikx, P., et Calavas, D., et Desprat, A., et Languille, J., et Comtet, L., et Pourquier, P., et Eléouët, J. F., et Delmas, B., et Marianneau, P., et Vitour, D., et Zientara, S. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *The Veterinary Research.* 2013, Vol. 44, 1, p. 31

Dubovi EJ. Molecular biology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech* **1990.** Mar;9(1):105-

Dubovi EJ. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals.* **2013**Jan;41(1):8-13

Echternkamp, S. E. Effects of ovulation rate and fetal number on fertility in twin-producing cattle. *Journal of animal Science.* 25 juin 2007, Vol. 85, 12, pp. 3228-3238.

El-Mahallawy H.S., Kelly P., Zhang J., Yang Y., Zhang H., Wei L., Mao Y., Yang Z., Zhang Z., Fan W., Wang C.: High seroprevalence of *Coxiella burnetii* in dairy cattle in China. *Trop Anim Health Prod* 2016, 48, 423–426.

Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells J. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland. *Vet Rec.* 1981 Jun 27;108(26):555-7

Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1994 Nov;10(3):463-78

Enriquez, B. et Beugnet, P. Les intoxications des ruminants par les antiparasitaires externes et les anthelminthiques. *Le Point Vétérinaire*. Numéro spécial 1998, Vol. 29, numéro spécial : Toxicologie des ruminants, pp. 113-120.

Entrican G, McCafferty MC, Maley SW, Buxton D. The importance of interferon-gamma in an early infection of *Chlamydia psittaci* in mice. *Immunology* 1994Apr;81(4):631-6

Esteves PA., Spilki FR., Franco AC., Silva TC., Oliveira EA., Moojen V., Esmeraldino AM., Roehe PM. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet Rec.* 2003 May 24;152(21):658-9

Euzéby, J. *Protozoologie médicale comparée*. Lyon : Collection fondation Marcel Mérieux, 1986. Vol. 1.

Faine S., Stallman N.D. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1982, 32 (4), 461-463.

FEADER fond européen agricole pour le développement rural, VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon. *Maîtriser les avortements (bovins, ovins, caprins)*. Rhône-Alpes : GDS Rhône-Alpes, 2010

Felleisen RS., Lambelet N., Bachmann P., Nicolet J., Müller N., Gottstein B. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):513-9

Fitzgerald pr., Johnson AE., Thorne JL., Hammond DM. Experimental infections of the bovine genital system with trichomonads from the digestive tracts of swine. *Am J Vet Res.* 1958 Oct;19(73):775-9

Fournier PE., Casalta JP., Piquet P., Tournigand P., Branchereau A., Raoult D. *Coxiella burnetii* infection of aneurysms or vascular grafts: report of seven cases and review. *Clin Infect Dis.* 1998 Jan;26(1):116-21

Fred, S. Chlamydia and chlamydial diseases of cattle: a review of the literature. *Veterinary Medicine.* 1984, 4, pp. 543-550.

Fredriksen, B., et Press, C. M., et Loken, T., et Odegaard, S. A. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology.* 1999, Vol. 64, 2-3, pp. 109-122.

Fuchs M, Hübert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol.* 1999 Aug;37(8):2498-507

Gane E. Future hepatitis C virus treatment: interferon-sparing combinations. *Liver Int.* 2011 Jan;31 Suppl 1:62-7

Ganière, J. P. *La brucellose animale*. s.l. : Document polycopié Mériat, 2010.

Gatsinzi T. Infertilité bovine en Afrique tropicale : contribution à l'étude de son impact économique. 1989.Thèse : Méd.vét.Dakar; 56.

GDS France, SNGTV. *Le protocole national de diagnostic différentiel des avortements chez les bovins*. 2013. version 30/01/2013.

GDS Loire-Atlantique. La conduite à tenir dans un élevage bovin présentant une suspicion clinique de salmonellose. 2014. [Citation: 15 avril 2014]
http://www.gds53.com/Assets/Client/ftp/GDS/GDS44/2010_GUIDESUSPICIIONSALMOEL_EVAGEBOVIN.PDF

Getachew T., Getachew G., Sintayehu G., Getenet M., Fasil A.: Bayesian estimation of sensitivity and specificity of rose bengal, complement fixation, and indirect ELISA tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Ethiopia. Vet Med Int 2016, Article ID 8032753, (<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8032753>).

Ghalmi F., China B., Losson B. Diagnostic et surveillance épidémiologique de *Neospora caninum*, Ann. Med. Vet., 2007, 151, 123-149.

Ghalmi F., China B., Kaidi R., Losson B.: *Neospora caninum* is associated with abortion in Algerian cattle. J Parasitol 2011, 97, 1121–1124.

Gibney, E. H., et Kipar, A., et Rosbottom, A., et Guy, C. S., et Smith, R. F., et Hetzel, U., et Trees, A. J., et Williams, D.J. L. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *International Journal for Parasitology*. 579-588 2008, Vol. 38, 5.

Gill, P.A., et Boulton, J.G., et Fraser, G.C., et Stevenson, A.E., et Reddacliff, L.A. Bovine abortion caused by *Listeria ivanovii*. *Australian Veterinary Journal*. mars 1997, Vol. 75, 3, p. 214.

Gillespie, J. H., et Schlafer, D. H., et Foote, R. H., et Quick, S., et Dougherty, E., et Schiff, E., et Allen, S. Comparison of persistence of seven bovine viruses on bovine embryos following in vitro exposure. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*1990, Vol. 97, 2, pp. 65-68.

Godin A.C., Björkman C., Englund S., Johansson K.E., Niskanen R., Alenius S.: Investigation of *Chlamydophila* spp. In dairy cows with reproductive disorders. *Acta Vet Scand* 2008, 50, 39.

Gorkiewicz G, Feierl G, Schober C, Dieber F, Köfer J, Zechner R, Zechner EL. Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2537-46

Goyal, S. M. et Ridpath, J. F. *Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management, and control*. Ames: Blackwell publishing, 2005.

Garcia-Vazquez Z., Rosario-Cruz R., Ramos-Aragon A., Cruz-Vazquez C., Mapes-

Sanchez G. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet. Parasitol.*, 2005, 134, 61-65.

Grimont F., Lenormand P., Burguière P., Beutin L., Grimont PA. Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Res Microbiol.* 2000 Oct;151

Grooms, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice.* 2004, Vol. 20, pp. 5-19.

Grooms, D. L., Brock, K. V. et Ward, L. A. Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 1998, Vol. 10, 2, pp. 125-129.

Grooms D. L., Brock K. V. et Ward, L. A. Detection of cytopathic bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhea virus vaccine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 1998, Vol. 10, 2, pp. 130-134.

Grosjean J., et Clavé D., Archambaud M., et Pasquier C. *Bactériologie et virologie pratique, 2ème édition révisée.* Bruxelles : De boeck, 2011.

Guatteo R., et Seegers H., Joly A., Remy, D., et Beaudeau, F. Diagnostic et prévention de l'infection par *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q. *Bulletin des GTV.* Avril 2009, 48, pp. 41-51.

Guatteo R., et Seegers H., Taurel A.F., Joly A., Beaudeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants : A critical review. *Veterinary Microbiology.* vol 149 2011, pp. 1-16.

Guatteo, R. Les avortements infectieux chez les bovins...vers une démarche standardisée. Autun, 2012. 27ème journée technique du GTV Bourgogne. pp. 4-16.

Guerin, P. Cours : pathologies de la gestation. 2010

Gyles C. L., et Prescott J.F., Songer J.G., et Thoen C.O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals.* 4ème édition. Ames : Wiley-Blackwell, 2010.

Hage J. J., et Schukken Y. H., et Barkema H. W., et Benedictus G., et Rijsewijk F. A., Wentink G. H. Population dynamics of bovine herpes virus 1 infection in a dairy herd. *Veterinary Microbiology.* 1996, Vol. 53, 1-2, pp. 169-180.

Hamers C., Di Valentin E., Lecomte C., Lambot M., Joris E., Genicot B., Pastoret PP. Virus neutralizing antibodies against 22 bovine viral diarrhea virus isolates in vaccinated calves. *Vet J.* 2002 Jan;163(1):61-7

Herder V., et Wohlsein P., et Peters, M., et Hausmann, F., et Baumgärtner W. Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmollenberg virus in Germany. *Veterinary Pathology.* 2012, Vol. 49, 4, pp. 588-591.

Hezil D. 2014. Étude de la prévalence de *Salmonella enterica* et de *Salmonella enterica*

serovar Dublin chez les bovins de la région d'Alger : comparaison entre les méthodes bactériologiques et immunologiques. Mémoire de magister en Sciences Vétérinaires

Ho T., Htwe KK., Yamasaki N., Zhang GQ., Ogawa M., Yamaguchi T., Fukushi H., Hirai K. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol Immunol.* 1995;39(9):663-71

Hum S, Quinn K, Brunner J, On SL. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J.* 1997 Nov;75(11):827-31

Isogai E., Isogai H., Kubota T., Fujii N., Hayashi S., Indoh T., Takagi S., Miura H. Kimura K. Apoptosis of lymphocytes in mice administered lipopolysaccharide from *Leptospira interrogans*. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998 Nov;45(9):529-37

Jaspers U, Thiele D, Krauss H. Monoclonal antibody based competitive ELISA for the detection of specific antibodies against *Coxiella burnetii* in sera from different animal species. *Zentralbl Bakteriologie.* 1994 Jun;281(1):61-6

Jay AN. Role of the airway epithelium in defense against inhaled invaders. *COPD.* 2005 Sep;2(3):285-7

Kaltenboeck, B. Reinfection with *Chlamydia abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydia*. *Infection and Immunity.* 2538-2545 mai 2004, Vol. 72, 5.

Kaltenboeck, B., Hehnen, H. R. et Vlaganov, A. Bovine *chlamydia* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? *Veterinary Research Communication.* 2005, 29(supplément 1), pp. 1-15.

Khames M., Mick V., de Miguel MJ., Girault G., Conde-Álvarez R., Khelef D., Oumouna M., Moriyón I., Muñoz PM., Zúñiga-Ripa A. The characterization of *Brucella* strains isolated from cattle in Algeria reveals the existence of a *B. abortus* lineage distinct from European and Sub-Saharan Africa strains. *Vet Microbiol.* 2017 Nov; 211:124-128

Knudtson WU., Kirkbride CA. Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA). *J Vet Diagn Invest.* 1992 Apr ;4(2) :181-5

Kocabiyik A.L., Cetin C. Bovine leptospirosis in south Marmara region of Turkey: A serological survey. *Revue Méd. Vét.,* 2004, 155, 12, 606-608.

Kpomassi T., 1991. Epidémiologie des affections abortives des bovins au Togo Enquête sérologique sur la Brucellose, la Chlamydie et la Fièvre Q. Thèse : Méd.Vét. : Dakar ; II

Kuhne S, Schroeder C, Holmquist G, Wolf G, Horner S, Brem G, Ballagi A. Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle--testing tissue samples derived from ear tagging using an Enns capture ELISA. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005 Aug;52(6):272-7

Laidebeure S. Etude du rôle de la faune sauvage exogène (rongeurs, carnivores, oiseaux) dans la transmission de la leptospirose, la pseudotuberculose et la toxoplasmose aux animaux du parc zoologique de la Palmyre (Charente-Maritime). (Thèse Méd. Vét) ENVA, 2004, 103 p.

Landman D., Quale JM., Oydna E., Willey B., Ditore V., Zaman M., Patel K., Saurina G., Huang W. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1996 Mar ;34(3) :751-2

Langston CE, Heuter KJ. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003 Jul;33(4):791-807

Lanyon SR, Reichel MP. Bovine viral diarrhoea virus ('pestivirus') in Australia: to control or not to control. *Aust Vet J.* 2014 Aug;92(8):277-82

Le Dréan E. Evaluation of a commercial real-time reverse transcription polymerase chain reaction kit for the diagnosis of Bovine respiratory syncytial virus infection. *J Vet Diagn Invest.* 2010 Mar;22(2):238-41

Lefèvre, P. C., et Blancou, J., et Chermette, R., et Uilenberg, G. *Infectious and parasitic diseases of livestock.* Paris, Cachan : Tec & Doc Lavoisier, 2010.

Legrand A. [The birth of the International French-speaking Federation of Clinical Biology and Laboratory Medicine]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2007 Sep-Oct;65(5):461-2

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Apr;14(2):296-326

Levett PN. Prevention and treatment of leptospirosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2004 Apr;2(2):293-8

Lilenbaum W, Souza GN. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Vet Sci.* 2003 Dec;75(3):249-51

Limbouurg I., Legrain S., De Potter P. [Transpupillary thermotherapy for treatment of choroidal melanomas]. *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 2002;(285):55-64

Lindberg AL, Alenius S. Principles for eradication of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol.* 1999 Jan;64(2-3):197-222

Lopez-Gatius, F. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. *Theriogenology.* Mars 2005, pp. 1298-1307.

Lucchese L., Benkirane A., Hakimi I., El Idrissi A., Natale A.: Seroprevalence study of the main causes of abortion in dairycattle in Morocco. *Vet Ital* 2016, 52, 13–19.

Lynch, G. P. Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle. *Journal of dairy Science.* septembre 1972, Vol. 55, 9, pp. 1243-1255.

Martel, J. L. Les salmonelloses chez les ruminants. *Le Point Vétérinaire.* n°221 Décembre 2001, pp. 30-34.

Masri SA., Nguyen PT., Gale SP., Howard CJ., Jung SC. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can J Vet Res.* 1997 Jan;61(1):15-20

Maillard I, Pear WS. Notch and the immune system. *Immunity.* 2003 Dec;19(6):781-91

Meissonier E. Intoxication par les nitrates chez les ruminants. *Le Point Vétérinaire.* décembre-janvier 1978, Vol. 6, 30, pp. 67-70.

Milleman, Y., Remy, D. et Brugère-Picoux, J. La listériose des ruminants 1- Etiologie, pathogénie et épidémiologie 2- Diagnostic, traitement et prévention. *Le Point Vétérinaire.* juin 2000, Vol. 31, 208, pp. 37-46.

Miller R., Nakavuma J.L., Ssajjakambwe P., Vudriko P., Musisi N., Kaneene J.B.: The prevalence of brucellosis in cattle, goats and humans in rural Uganda: a comparative study. *Transbound Emerg Dis* 2016, 63, 197–210.

Morrell, E.L., et Barbeito, C. G., et Odeon, C.A., et Gimeno, E.J., et Campero, C.M. Histopathological, immunohistochemical, lectin histochemical and molecular findings in spontaneous bovine abortions by *Campylobacter fetus*. *Reproduction in Domestic Animals.* avril 2011, Vol. 46, 2, pp. 309-315.

Mshelia GD, Amin JD, Woldehiwet Z, Murray RD, Egwu GO. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reprod Domest Anim.* 2010 Oct;45(5): e221-30

Mukakanamugire A. Séroprévalence de la Néosporose et incidence sur les paramètres de la reproduction dans les élevages bovins laitiers périurbains de Dakar (Sénégal). 2008.Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 1.

Murgia R, Riquelme N, Baranton G, Cinco M. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiol Lett* 1997.Mar 1;148(1):27-34

Murphy, F. A., et Gibbs, E. P., et Horzinek, M. C., et Studdert, M. J. *Veterinary virology.* 3ème édition. San Diego: Academic press, 1999.

Murray, R. D. Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Archives of Virology, supplementum.* 1991, Vol. 3, pp. 217-224.

Muylkens B., Thiry J., Kirten P., Schynts F., Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res.* 2007 Mar-Apr;38(2):181-209

Nam HM., Murinda SE., Nguyen LT., Oliver SP. Evaluation of universal pre-enrichment broth for isolation of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* from dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathog Dis.* 2004 Spring;1(1):37-44

Nandi J., Saud B., Zinkievich JM., Palma DT., Levine RA. 5-aminosalicylic acid improves indomethacin-induced enteropathy by inhibiting iNOS transcription in rats. *Dig Dis Sci.* 2007 Jan;53(1):123-32

Nandi S., Gangopadhyay S., Ghosh S. Lipase catalyzed synthesis of neutral glycerides rich in micronutrients from rice bran oil fatty acid distillate. *J Oleo Sci.* 2008;57(11):599-603

Nandi S., Ulasov IV., Rolle CE., Han Y., Lesniak MS. A chimeric adenovirus with an Ad 3 fiber knob modification augments glioma virotherapy. *J Gene Med.* 2009 Nov;11(11):1005-11

Nataro JP., Stokes MG, Titball RW, Neeson BN, Galen JE, Walker NJ, Stagg AJ, Jenner DC., Thwaite JE., Baillie LW., Atkins HS. Oral administration of a *Salmonella enterica*-based vaccine expressing *Bacillus anthracis* protective antigen confers protection against aerosolized *B. anthracis*. *Infect Immun.* 2007 Apr;75(4):1827-34

Neïkov, P. Pathomorphological studies of aborted fetuses from sheep infected with *R. burneti*. *Veterinarno meditsinski nauki.* 1987, Vol. 24, 1, pp. 36-43.

Ngbede EO., Raji MA., Kwanashie CN., Okolocha EC., Gugong VT., Hambolu SE. Serological prevalence of leptospirosis in cattle slaughtered in the Zango abattoir in Zaria, Kaduna State, Nigeria. *Vet Ital.* 2012 Apr-Jun;48(2):179-84

Nielsen L.R.: Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella dublin* in cattle. *Vet Microbiol* 2013, 162, 1–9.

Niculescu G. [Experimental studies of the efficacy of the bacterial preparations Thuringin plus Thurintox and Dipel on some species of insects of medical and sanitary importance]. *Rev Ig Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol Pneumoftiziol Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.* 1981 Oct-Dec;26(4):247-55

Nietfeld JC, Dubey JP, Anderson ML, Libal MC, Yaeger MJ, Neiger RD. Neospora-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1992;4:223-226.

Njaa BL, Clark EG, Janzen E, Ellis JA, Haines DM. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagn Invest.* 2000 Sep ;12(5) :393-9

Noakes D. E., Parkinson T. J. et England G. C.W. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*, 8th edition. Londres : W.B. Saunders, 2006.

OIE. Carte de distribution des maladies. *oie*. [Citation: 10 décembre 2013] http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap/index/newlang/fr.

OIE. Maladies de la liste de l'OIE en 2013. *OIE*. [En ligne] 2013. [Citation : 19 septembre 2013.] <http://oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/maladies-de-la-liste-de-loie-2013/>.

On SL, Harrington CS. Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *J Appl Microbiol.* 2001 Feb;90(2):285-93

Olafson, P., MaCallum, A. et Fox, F. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Veterinarian*. 1946, Vol. 36, pp. 205-213.

Ortega-Mora, L. M., et Gottstein, B., et Conraths, F. J., et Buxton, D. *Protozoal abortion in farm ruminants*. Wallingford : CABI, 2007.

Otter A, Jeffrey M, Griffiths IB, Dubey JP. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet Rec* 1995;136: 602-606.

Pappas E., Maris TG., Zacharopoulou F., Papadakis A., Manolopoulos S., Green S, Wojnecki C. Small SRS photon field profile dosimetry performed using a PinPoint air ion chamber, a diamond detector, a novel silicon-diode array (DOSI), and polymer gel dosimetry. Analysis and intercomparison. *Med Phys*. 2008

Pangloli P, Dje Y, Oliver SP, Mathew A, Golden DA, Taylor WJ, Draughon FA. Evaluation of methods for recovery of Salmonella from dairy cattle, poultry, and swine farms. *J Food Prot*. 2003 Nov;66(11):1987-95

Pardon P., Sanchis R., Marly J., Lantier F., Pépin M., Popoff M. [Ovine salmonellosis caused by Salmonella abortus ovis]. *Ann Rech Vet*. 1988

Paré, J., Thurmond, M. C. et Hietala, S. K. Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Canadian Journal of Veterinary Journal*. 1996, Vol. 60, 2, pp. 133-139.

Peiffer J. Assessing neuropathological research carried out on victims of the "euthanasia" programme. With two lists of publications from Institutes in Berlin, Munich and Hamburg. *Medizinhist J*. 1999;34

Peter D, Cyrot M, Mayou D, Khanna SN. Kinetic energy of electrons on a two-dimensional lattice with commensurate flux. *Phys Rev B Condens Matter*. 1989 Nov 1;40(13):9382-9384

Péter O, Dupuis G, Peacock MG, Burgdorfer W. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of Coxiella burnetii antibody. *J Clin Microbiol*. 1987 Jun;25(6):1063-7

Perolat P, Baranton, Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between Leptospira collections: application to L. meyeri. *Res Microbiol*. 2000 Jun;151(5):333-41

Potgieter LN. Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1995 Nov;11(3):501-20

Potter, M. L., et Corstvet, R. E., et Looney, C. R., et Fulton, R. W., et Archbald, L. F., et Godke, R. A. Evaluation of bovine viral diarrhea virus uptake by preimplantation embryos. *American Journal of Veterinary Research*. 1984, Vol. 45, 9, pp. 1778-1780.

Quinn, P. J., et Markey, B.K., et Leonard, F.C., et Fitzpatrick, E.S., et Fanning, S., et Hartigan, P.J. *Veterinary microbiology and microbial disease, second edition*. Ames : Wiley-Blackwell, 2011.

Rae, D. O. et Crews, J. E. *Trichomonas fetus. The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*. 2006, Vol. 22, 3, pp. 595-611.

Raoult D, Laurent JC, Mutilod M. Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues. *Am J Clin Pathol*. 1994 Mar;101(3):318-20

Ridpath JF. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals*. 2013 Jan;41(1):14-9. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.07.003

Rocha MF., Soares AM., Ribeiro RA., Lima AA. Absence of intestinal secretion on supernatants from macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin B on rabbit ileum. *Toxicon*. 2001 Feb-Mar;39(2-3):335-40

Roehe R., Nagamine Y., Awata T., Kalm E. Genetic parameters for ultrasonic fat thickness of Japanese Shorthorn cattle. *J Anim Breed Genet*. 1997 Jan106-99:(6-1)114;12

Rousset E., Durand B., Berri M., Dufour P., Prigent M., Russo P., Delcroix T., Touratier A., Rodolakis A., Aubert M. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet Microbiol*. 2007 Oct Epub 2007

R S Pawaiya, V K Gupta. A review on Schmallenberg virus infection: a newly emerging disease of cattle, sheep and goats. *Veterinari Medicina*, 58, 2013 (10) : 516–526

Sachse K., Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischil A., Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol*. 2008

Sandvik T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programs. *Prev Vet Med*. 2005 Nov 15;72(1-2):3-16; discussion 215-9

Sanhueza J.M., Heuer C., West D.: Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Prev Vet Med* 2013,112, 90–98.

Saliki JT, Dubovi EJ. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2004 Mar;20(1):69-83

Schelcher F, Espinasse J, Peel JE, Voirol MJ, Valarcher JF. Absence of circulating TNF alpha in experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet Rec* 1993.Mar 20;132(12):303-4.

Schelcher, F. et Valarcher, J. F. Physiopathologie des salmonelloses bovines. *Bulletin des GTV*. n°2 Juillet 1997, pp. 25-30.

Simon M, Dusinský R, Horín P, Duraj J, Bilka F, Tomášková J. A polymorphic monoclonal anti-BoLA class I antibody. *Anim Genet.* 1994 Oct;25(5):347-8 Houe H, Lindberg A, Moennig V. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest.* 2006 Sep;18(5):427-36

Skirrow, S. Z. et Bondurant, R. H. Induced *Tritrichomonas foetus* infection in beef heifers. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1990, Vol. 196, 6, pp. 885-889.

Smith, 1990. Large Animal Internal Medicine. The C.V. Mosby Company. 1787 p.

Smith CR, Ketterer PJ, McGowan MR, Corney BG. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. *Aust Vet J.* 1994 Sep;71(9):290-4

Spyridaki I, Psaroulaki A, Loukaides F, Antoniou M, Hadjichristodoulou C, Tselentis Y. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction PCR and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jan;66(1):86-90

Straub OC. [Development of an inactivated vaccine for the protection of cattle against Aujeszky's disease]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1990 Jul 225:(7)103

Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med.* 2011 Jan-Feb;25(1):1-13

Talafha A.Q., Ababneh M.M., Ababneh M.M., Al-Majali A.M.: Prevalence and risk factors associated with *Chlamydophila abortus* infection in dairy herds in Jordan. *Trop Anim Health Prod* 2012, 44, 841–846.

Tavares Clemente, M. L., et Bragança Barahona, M.J., et Capela Andrade, M.F., et Botelho, A.R., et Vicari, N. Diagnosis by PCR-REA of *Chlamydophila* species infections in late-255 term abortions of domestic ruminants. *The Veterinary Record.* 11 juin 2011, Vol. 168, 23, p. 619.

Terpstra OT. [Bile duct injury after cholecystectomy: risk of mortality substantially higher]. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2004 Oct 23;148(43):214

Thiry, E., et Lemaire, M., et Schynts, F., et Vanderheijden, N., et Meyer, G., et Dispas, M., et Pastoret, P. P. La rhinotrachéite infectieuse bovine: caractéristiques du virus, l'infection et ses manifestations cliniques. *Bulletin des GTV.* 1997, 4, pp. 7-16.

Toma B., Dufour B., Sanaa M., Beneet J. J., Shaw A., Moutou F., Louza A. Epidémiologie appliquée à la lutte contre les maladies animales transmissibles majeures. AEEMA, 2001, Maison-Alfort, France, 696p.

Toma, B. *Les zoonoses infectieuses.* s.l. : Document photocopié Mérial, 2010.

Trávnicek M, Cisláková L, Deptula W, Stosik M, Bhide MR. Wild pigeons and pheasants-a source of *Chlamydothyla psittaci* for humans and animals. *Ann Agric Environ Med*. 2002;9(2):253-5

Truylers I., Luke T., Wilson D., Sargison N. Diagnosis and management of venereal campylobacteriosis in beef cattle. *BMC Vet Res*. 2014 Nov 27; 10:280. doi: 10.1186/s12917-014-0280-x.

van Bergen MA, Linnane S, van Putten JP, Wagenaar JA. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev Sci Tech*. 2005 Dec;24(3):1017-26

VanderLey B., Ridpath J., Sweiger S. Comparison of detection of Bovine virus diarrhea virus antigen in various types of tissue and fluid samples collected from persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest*. 2011 Jan;23(1):84-6

Veling J, van Zijderveld FG, van Zijderveld-van Bommel AM, Schukken YH, Barkema HW. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for detecting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin antibodies in bulk milk. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Nov;8(6):1049-55

Vieira EP, Hermel H, Möhwald H. Change and stabilization of the amyloid-beta (1-40) secondary structure by fluorocompounds. *Biochim Biophys Acta* 2003 .Jan 31;1645(1):6-14

Villagra-Blanco R, Dolz G, Montero-Caballero D, Romero-Zúñiga JJ. Detection of antibodies against *Chlamydothyla abortus* in Costa Rican sheep flocks. *Open Vet J*. 2015

Waag D., Chulay J., Marrie T., England M., Williams J. Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995 . May;14(5):421-7

Wagenaar JA, van Bergen MA, Newell DG, Grogono-Thomas R, Duim B. Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun;39(6):2283-6

Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12):4744-7

Yang N., Cui X., Qian W., Yu S., Liu Q.: Survey of nine abortifacient infectious agents in aborted bovine fetuses from dairy farms in Beijing, China, by PCR. *Acta Vet Hung* 2012, 60, 83-92

Yildiz K, Kul O, Babur C, Kilic S, Gazyagci AN, Celebi B, Gurcan IS. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. *Vet Parasitol*. 2009 Oct 14;164(2-4):306

Youngquist, Threlfall et Walter R., 2007. Current Therapy in Large Animal Theriogenology2. Second Edition. 1061 p.

Zhai L., Kong X., Lu Z., Lv F., Zhang C., Bie X.: Detection of *Salmonella enterica* serovar Dublin by polymerase chainreaction in multiplex format. J Microbiol Methods 2014, 100, 52-57.

Zimmer LA, Gillman G, Barnes L. Postauricular epithelioid sarcoma. Otolaryngol Head Neck Surg. 2004 Dec;131(6):1022-3

ANNEXE

Questionnaire épidémiologique destiné aux éleveurs bovins

Les informations concernant l'exploitation

*** Nom et prénom de l'éleveur :**

*** Adresse de l'exploitation :**

*** Commune :**

*** Type de production ?**

- ☐ Viandeuse
- ☐ Laitière
- ☐ Mixte
- ☐ Allaitant

*** Mode d'élevage ?**

- ☐ Extensif
- ☐ Semi-extensif
- ☐ Intensif

*** Taille du troupeau ?**

- ☐ ≤ 10
- ☐ > 10

*** Présence de petits ruminants ?**

- ☐ Oui
- ☐ Non

*** État d'hygiène général de l'exploitation ?**

- ☐ Bon
- ☐ Moyen
- ☐ Mauvais

*** Mode de reproduction ?**

- ☐ Naturelle
- ☐ Artificielle

*** L'isolement des animaux nouvellement acquis ?**

- ☐ Oui
- ☐ Non

***pâturage en commun avec d'autres troupeaux ?**

☐ Oui

☐ Non

Informations sur l'animal prélevé

***Numéro de l'animal prélevé s'il existe :.....**

***Race :.....**

***Age :.....**

***Source de la vache ?**

☐ Née dans la ferme

☐ Achetée

***Gestante ?**

☐ Oui

☐ Non

Si gestante ?

☐ Primipare

☐ Multipare

***Le mois de gestation.....**

***Avortement ?**

☐ A déjà avorté

☐ Jamais avorté

***Stade de gestation au moment de l'avortement ?**

☐ Entre 1-3mois

☐ Entre 3-6mois

☐ Entre 6-9mois