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

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة
ربيع بوشامة

THESE

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

Thème :

Étude des avortements et des lésions fœtales induits par *Neospora caninum* chez la race bovine locale infectée naturellement

Présentée par : ABDELTIF Besma

Soutenue le 14/06/2022

Les membres du jury :

Présidente	: HAFSI Fella	Professeure	E.N.S.V.
Rapporteure	: GHALMI Farida	Professeure	E.N.S.V.
Co-rapporteure	: TENNAH Safia	Professeure	E.N.S.V.
Examinateurs	: LAFRI Ismail	M.C.A.	Université Saad Dahlab de Blida1
	: RAHAL mohamed	M.C.A.	Université Yahia Farès de Médéa
	: SALHI Omar	M.C.A.	Université Saad Dahlab de Blida1

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu « **ALLAH** » le tout puissant de nous avoir accordé la santé, le courage et les moyens pour suivre nos recherches.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice de thèse, le professeur **GHALMI Farida**, pour toute son aide, son appui scientifique, son soutien, sa grande disponibilité et ses précieux conseils au cours de l'élaboration de cette thèse. Je vous témoigne le plus profond de mes plaisirs de travailler avec vous.

Je remercie le professeur **TENNAH Safia** ma co-directrice de thèse, pour ses conseils, ses encouragements, son soutien et son aide scientifique inestimable durant la réalisation de ma thèse.

Je remercie cordialement le Professeur **HAFSI Falla** d'avoir accepté d'être la présidente du jury de notre thèse. Veuillez trouver ici, le témoignage de mon admiration et de mon respect.

Nous souhaitons également remercier les membres du jury : Docteur **LAFRI Ismail**, Docteur **RAHAL Mohamed** et Docteur **SALHI Omar** pour avoir accepté d'évaluer ce travail et d'avoir pris le temps de le lire et d'y avoir accordé du temps.

Mes sincères remerciements à tous les enseignants de l'E.N.S.V. en particulier Docteur **DERDOUR Salima-Yamina** et Docteur **LAAMARI Abdelouahab** pour m'avoir toujours encouragée et à l'ensemble du personnel de l'E.N.S.V. en particulier Monsieur **DERFALOU Kamal** pour ses encouragements même après son départ à la retraite.

Mes sincères remerciements s'adressent aux Docteur **NOUICHI Siham** et Docteur **ACHAK Rachid** pour leurs conseils et leurs aides précieuses.

Nous tenons également à remercier l'ensemble du personnel de centre de recherche en biotechnologies de Constantine pour leurs aides et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de recherche.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mon très cher père et à ma très chère mère que ce travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

À la mémoire de ma tante « ma deuxième mère » qui est toujours dans mon esprit et dans mon cœur. Je te dédie aujourd'hui ma réussite et que Dieu le miséricordieux t'accueille dans son éternel paradis.

À mes frères et mes sœurs qui avec cette question récurrente, **« quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? »**, bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

À ma très chère nièce je vous aime de tout mon cœur.

À tous ceux que j'aime et qui m'ont toujours soutenu, chacun à leur façon.

Mrs. ABDELTIF Besma

Résumé

Neospora caninum est l'un des organismes infectieux les plus répandus dans le monde provoquant des avortements chez les bovins. À ce jour, aucune étude antérieure ne s'est intéressée à l'infection par *N. caninum* chez les bovins de la race locale au Nord-Est de l'Algérie. Cette étude visait à évaluer l'importance de *Neospora caninum* comme agent abortif chez les vaches de la race locale. Une étude cas-témoin a été menée dans 60 élevages témoins (absence d'avortement) et 30 élevages cas (présence d'avortement). Un total de 650 échantillons de sang a été collecté, tous issus de vaches gestantes appartenant à 90 élevages différents, dans cinq régions de l'Algérie (Jijel, Skikda, Annaba, El-Tarf et Souk-Ahras). Des échantillons de sérum ont été analysés par dosage immuno-enzymatique, pour rechercher des anticorps dirigés contre *N. caninum*. La séroprévalence de l'infection par *N. caninum* obtenue chez les vaches était de 36,2 % (IC à 95% :32,7-39,8) et au niveau des élevages, elle était de 81,1 % (IC à 95 % : 73,0-89,2). Les facteurs de risque identifiés par régression logistique multivariée comprenaient : la présence de chiens (odds ratio [OR] 4,7, 95 IC 2,9-7,3) ; âge ≥ 84 mois (OR 4,9, 95 IC 2,8-8,3) ; la région de Jijel (OR 2,2, 95 IC 1,1-4,5) ; la robe blanche (OR 2,5, 95 IC 1,4-4,4) et grise (OR 2,5, 95 IC 1,4-4,5) ; une hygiène modérée (OR 2,30, 95 IC 1,4-3,8) et mauvaise (OR 3,1, 95 IC 1,8-5,3) et enfin, le deuxième (OR 2,5, 95 CI 1,4-4,4) et le dernier OR de 2,3 (95 IC 1,3-4,2) stade de la gestation. Notre étude cas-témoins n'a pu montrer aucune association significative entre la séropositivité à *N. caninum* et l'avortement observé au niveau des élevages OR de 0,9 (IC à 95% 0,3-2,7). De même, il n'y avait pas d'association significative entre la séroprévalence vis-à-vis de *N. caninum* et l'avortement observé au niveau individuel OR de 0,8 (IC à 95% 0,6-1,2).

L'histopathologie a été utilisée pour évaluer les lésions et la distribution de *N. caninum* dans les tissus fœtaux (le cerveau, le cœur, le foie, la rate, les poumons, les muscle squelettiques et les reins) et placentaires issus de 30 vaches locales naturellement infectées par *N. caninum*. Un total de 239 échantillons a été prélevé dans l'abattoir de Souk-Ahras et analysé par examen histologique. Parmi les 30 fœtus, six (n=6) ont montré des lésions et/ou des formations kystiques très compatibles avec une néosporose. Au total, 10/239 (4,18%) échantillons ont présenté des lésions caractéristiques d'une infection par *N. caninum*. Les lésions observées sont des foyers d'infiltration leucocytaire assez bénignes et des structures tissulaires semblables à des kystes à bradyzoïte de *N.caninum*.

En conclusion, notre travail s'est intéressé à une étude inédite sur l'infection par *N. caninum* chez des vaches locales gestantes du Nord-Est de l'Algérie. La séroprévalence des anticorps dirigés contre ce parasite était importante. La majorité des facteurs de risque analysés ont montré une relation significative avec la séroprévalence vis-à-vis de *N. caninum*. Bien que la transmission verticale de *N. caninum* semble prédominer chez la vache dans la région de notre étude, l'infection n'a cependant pas causé de lésions fœtales et placentaires étendues et sévères. Par conséquent, notre travail a renforcé l'hypothèse émise sur la résistance des vaches locales à l'avortement induit par *N. caninum*.

Mots clés : Algérie, *Neospora caninum*, Bovins de la race locale, Séro-épidemiologie, Histopathologie

Abstract:

Neospora caninum is one of the most prevalent infectious organisms worldwide causing abortions in cattle. To date, no previous study has focused on infection by *N. caninum* in the local breed cattle from Northeast Algeria. This study aimed to assess the importance of *N. caninum* as an abortifacient agent in cows of the local breed. A case-control study was conducted in 60 control farms (absence of abortion) and 30 case farms (presence of abortion). A total of 650 blood samples were collected, all from pregnant cows belonging to 90 different farms, in five regions of Algeria (Jijel, Skikda, Annaba, El-Tarf and Souk-Ahras). Serum samples were analyzed by enzyme immunoassay to search for antibodies directed against *N. caninum*.The seroprevalence of *N. caninum* infection in the cows was 36.2% (95% CI: 32.7-39.8) and in the farms was 81.1% (95% CI: 73.0-89.2). Risk factors found by multivariable logistic regression included: Presence of dogs (odds ratio [OR] 4.7, 95 CI 2.9-7.3); age ≥84 months (OR 4.9, 95 CI 2.8-8.3); Jijel region (OR 2.2, 95 CI 1.1-4.5); white (OR 2.5, 95 CI 1.4-4.4) and gray (OR 2.5, 95 CI 1.4-4.5) coat; moderate (OR 2.30, 95 CI 1.4-3.8) and bad (OR 3.1, 95 CI 1.8-5.3) hygiene; and second (OR 2.5, 95 CI 1.4-4.4); and last (OR 2.3, 95 CI 1.3-4.2) stage of pregnancy. Our case-control study showed no significant association between seropositivity of *N. caninum* and the abortion observed in the farms OR of 0.9 (95% CI 0.3-2.7). Likewise, there was no significant association between seroprevalence towards *N. caninum* and abortion observed at the individual level OR of 0.8 (95% CI 0.6-1.2).

Histopathology has been used to assess the lesions and distribution of *N. caninum* in fetal tissues (brain, heart, liver, spleen, lungs, skeletal muscle and kidneys) and placental from 30 cows Naturally infected with *N. caninum*. A total of 239 samples was taken from the slaughterhouses of Souk-Ahras and analyzed by histological examination. Among the 30 fetuses, six (n = 6) showed lesions and/or cystic formations extremely compatible with neosporosis. A total of 10/239 (4.18%) samples presented lesions characteristic of an infection by *N. caninum*. The lesions observed are benign leukocyte infiltration foci and tissue structures similar to *N.caninum* bradyzoite cysts.

In conclusion, our work was interested in an unprecedented study on *N. caninum* infection in local cows from Northeast Algeria. The seroprevalence of antibodies directed against this parasite was important. The majority of risk factors analyzed showed a significant relationship with seroprevalence of *N. caninum*. Although the vertical transmission of *N. caninum* seems to predominate in cow in the region of our study, however, the infection did not caused extensive and severe fetal and placental lesions. Consequently, our work has strengthened the hypothesis emitted on the resistance of local cows to abortion induced by *N. caninum*.

Keywords: Algeria, *Neospora caninum*, Local breed cattle, Seroepidemiology, Histhopathology.

ملخص

البوغة الجديدة الكلبية هي واحدة من الطفيليات المعدية الأكثر انتشارًا في العالم التي تسبب الإجهاض عند الأبقار. حتى الآن ، لا توجد دراسة سابقة مهتمة بالعدوى الناتجة عن البوغة الجديدة الكلبية عند أبقار السلالة المحلية في شمال شرق الجزائر. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم أهمية البوغة الجديدة الكلبية في إحداث الإجهاض عند أبقار السلالة المحلية. أجريت دراسة للحالات والشواهد على 60 مزرعة من الشواهد (عدم الإجهاض) و30 مزرعة من الحالات(وجود الإجهاض). تم جمع ما مجموعه 650 عينة من الدم ، جميعها من الأبقار الحوامل والتي تنتمي إلى 90 مزرعة مختلفة ، في خمس مناطق من الجزائر (جيجل, سكيكدة , عنابة , الطارف وسوق أهراس) . تم تحليل عينات المصل باستخدام تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم للبحث عن وجود الأجسام المضادة ضد البوغة الجديدة الكلبية. كان الانتشار المصلي لعدوى البوغة الجديدة الكلبية في الأبقار 36.2٪ (مجال الثقة 95٪:32.7-39.8) وفي المزارع كان 81.1٪ (م ث 95٪:73.0-89.2). تضمنت عوامل الخطر التي تم تحديدها بواسطة الانحدار اللوجستي متعدد المتغيرات ما يلي: وجود الكلاب (نسبة الأرجحية 4.7 م ث 95 2.9 – 7.3) ؛ العمر ≤84 شهرًا (ن أ 4.9 م ث 95 : 2.8 – 8.3)؛ منطقة جيجل (ن أ 2.2 م ث 95 : 1.1 – 4.5)؛ اللون الأبيض للأبقار(ن أ 2.5 م ث 95 : 1.4 – 4.4)؛ اللون الرمادي (ن أ 2.5 م ث 95 : 1.4 – 4.5)؛ غياب النظافة (ن أ 3.1 م ث 95 : 1.8 – 5.3) ؛ نظافة متوسطة (ن أ 2.3 م ث 95 : 1.4 – 3.8) ؛ المرحلة الثانية من الحمل (ن أ 2.5 م ث 95 :1.4 – 4.4) ؛ المرحلة الأخيرة من الحمل (ن أ 2.3 CI 95 :1.3 – 4.4). دراستنا للحالات والشواهد لم تتمكن من إظهار أي ارتباط بين المصول الإيجابية للبوغة الجديدة الكلبية والإجهاض الذي لوحظ على مستوى المزارع (ن أ 0.9 م ث 95 :0.3 – 2.7) وبالمثل ، لم يكن هناك ارتباط كبير بين الانتشار المصلي للبوغة الجديدة الكلبية والإجهاض الذي لوحظ على المستوى الفردي (ن أ 0.8 م ث 95 :0.6 – 1.2).

تم استخدام الفحص النسيجي المرضي لتقييم الآفات وتوزيع البوغة الجديدة الكلبية في أنسجة الجنين (الدماغ، القلب، الكبد، الطحال، الرئتين، العضلات الهيكلية والكلى) والمشيمة من 30 بقرة محلية مصابة بشكل طبيعي بالبوغة الجديدة الكلبية. تم أخذ ما مجموعه 239 عينة من مسخ سوق أهراس وتم تحليلها عن طريق الفحص النسيجي. من بين 30 جنين ، أظهرت ستة (ن = 6) آفات و/أو تكوينات كيسية متوافقة للغاية مع ما تسببه البوغة الجديدة الكلبية. ما مجموعه 239/10 (4.18 ٪) عينة قدمت آفات مميزة لعدوى البوغة الجديدة الكلبية .الآفات التي تمت ملاحظتها هي بؤرحميدة إلى حد ما لتسلل الكريات البيضاء و تكوينات كيسية نسيجية مماثلة للأكياس النسيجية للبوغة الجديدة الكلبية في الطور المزمن.

في الختام ، كان عملنا مهتمًا بإجراء دراسة غير مسبوقة حول عدوى البوغة الجديدة الكلبية عند الأبقار المحلية في شمال شرق الجزائر. كان الانتشار المصلي للأجسام المضادة الموجهة ضد هذا الطفيل كبير . أظهرت غالبية عوامل الخطر التي تم تحليلها وجود علاقة كبيرة مع الانتشار المصلي تجاه البوغة الجديدة الكلبية .على الرغم من أن الانتقال الرأسي للبوغة الجديدة الكلبية يبدو أنه الانتقال السائد عند الابقار في منطقة دراستنا ، إلا أن العدوى لم تسببت في آفات واسعة وشديدة في الجنين والمشيمة. وبالتالي ، عزز عملنا فرضية مقاومة الأبقار المحلية للإجهاض الناجم عن البوغة الجديدة الكلبية.

الكلمات المفتاحية: الجزائر ، البوغة الجديدة الكلبية ، أبقار السلالة المحلية ، الانتشار المصلي ، الفحص النسيجي المرضي.

Sommaire

Introduction Générale
Revue de la littérature
I. Aperçu sur le bovin local en Algérie **3**
II. Néosporose et *Neospora caninum* **6**
II.1. Introduction **6**
II.2. Pathogénie **7**
II.3.Réponse immunitaire à *N. caninum* chez les bovins **9**
II.3.1. Réponses immunitaires les bovins non gestants **9**
II.3.2. Réponses immunitaires les bovins gestants **10**
II.3.3. Réponses immunitaires fœtales bovines **12**
II.4. Symptômes **13**
II.5. Lésions **15**
II.6. Impact économique **16**
II.7. Découverte de *N. caninum* **17**
II.8. Classification de *N. caninum* **17**
II.9. Cycle de vie de *N. caninum* **18**
II.9.1. Hôtes intermédiaire et définitifs **18**
II.9.2. Stades infectieux de *N. caninum* **19**
II.9.2.1. Stade sporozoïte **19**
II.9.2.2. Stade tachyzoïte **20**
II.9.2.3. Stade bradyzoïte **21**
II.9.2.4. Stade de conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes **21**
II.9.3. Cycle évolutif **23**
II.10. Transmission de *N. caninum* **24**
II.10.1. Transmission verticale **24**
II.10.2. Transmission horizontale **25**
II.11. Répertoire antigénique de *N. caninum* **27**
II.11.1. Antigènes de surface **27**
II.11.2. Protéines des micronèmes **27**
II.11.3. Protéines des rhoptries **28**
II.11.4. Protéines des granulaires denses (GRA) **28**
II.12. Expression spécifique des antigènes de *N. caninum* **29**
II.13. Diagnostic de la néosporose bovine **30**
II.13.1. Examen des fœtus avortés **31**
II.13.1.1. Histopathologie **31**
II.13.1.1.1. Lésions macroscopiques **31**
II.13.1.1.2. Lésions microscopiques **31**
II.13.1.2. Immunohistochimie **32**
II.13.1.3. Détection moléculaire de *N. caninum* **33**
II.13.1.4. Détection d'anticorps dans les fluides fœtaux **34**
II.13.2. Diagnostic in vivo de la néosporose bovine **35**
II.13.2.1. Techniques sérologiques **35**
II.13.2.1.1. Immuno-absorption par enzyme liée (ELISA) **35**
II.13.2.1.1.1.Tachyzoïtes complets fixés **37**
II.13.2.1.1.2. Lysat de tachyzoïtes **37**
II.13.2.1.1.3. Immunostimulating complex (ISCOM) **38**
II.13.2.1.1.4. Antigènes recombinants ou purifiés **39**
II.13.2.1.1.5. ELISA de compétition (CI ELISA) **40**
II.13.2.1.1.6. ELISA de type avidité **41**

II.13.2.1.2. Test de d'immunofluorescence indirecte des anticorps **42**
II.13.2.1.3. Test d'agglutination de *Neospora* **43**
II.13.2.1.4. Western blot **43**
II.13.2.1.5. Test immunochromatographique **43**
II.13.2.1.6. Antigènes recombinants **44**
II.13.2.1.7. Serologie pré-colostrale **44**
II.13.2.1.8. Analyse du lait en vrac **44**
II.13.2.1.9. Limites actuelles des diagnostics sérologiques **45**
II.14. Séroprévalence de l'infection à *Neospora caninum* chez les bovins **48**
II.15. Facteurs de risque *à N. caninum* **49**
II.15.1. Âge **49**
II.15.2. Hôte définitif **49**
II.15.3. Hôtes intermédiaires autres que les bovins **50**
II.15.4. Pâturage, fourrage et eau potable **51**
II.15.5. Lait et colostrum **51**
II.15.6. Saison **51**
II.15.7. Densité **52**
II.15.8. Taille du troupeau **52**
II.15.9. Source de génisses de remplacement **52**
II.15.10. Climat **52**
II.16. Contrôle de la néosporose bovine **53**
II.16.1. Prévention de l'infection horizontale **53**
II.16.2. Gestion de la transmission verticale **54**
II.16.2.1. Tester et abattre **54**
II.16.2.2. Élevage sélectif **55**
II.16.2.3. Tester les reproductrices de remplacement **55**
II.16.2.4. Gestion de la reproduction **56**
II.16.2.5. Réduction des facteurs prédisposants **56**
II.16.3. Autres approches **57**
II.16.3.1. L'option « vivre avec la maladie » **57**
II.16.3.2. Vaccination **57**
II.16.3.3. Traitement anti protozoaire **58**

Etude pratique

I. Objectif et stratégie **59**
II. Matériel et Méthodes **59**
II.1. Etude Séro-épidemiologique **59**
II.1.1. Période et région d'étude **59**
II.1.2 Stratégie d'échantillonnage **60**
II.1.2.1. Etudes cas témoins **60**
II.1.2.2. Prélèvement sanguins **61**
II.1.3. Analyse sérologique **61**
II.1.3.1. Principe **61**
II.1.3.2. Matériels **62**
II.2.4.2. Méthode **63**
II.2. Etude histopathologique **66**
II.2.1 Période et lieu d'étude **66**
II.2.2. Prélèvement tissulaires **66**
II.2.2.1. Description de l'abattoir **66**
II. 2.2.2. Matériels **67**
II.2.2.3. Méthodes **68**

II.2.3. Analyses histopathologiques…… 70
II.3. Analyses statistiques…… 74
III. Résultat …… 75
III.1. Etude Séro-épidemiologique …… 75
III.1.1. Séroprévalence…… 75
III.1.2 Etude cas-témoins…… 76
III.1.3.Etude des facteurs de risque…… 78
III.1.3.1. Présence de chiens…… 78
III.1.3.2. Avortement…… 78
III.1.3.3. Age…… 78
III.1.3.4. Parité…… 79
III.1.3.5. Couleur de la robe …… 79
III.1.3.6. Stade de gestation…… 80
III.1.3.7. Hygiène…… 80
III.1.3.9. Région …… 81
III.1.3.8. Saison…… 82
III.1.3.9 Résumé de l'étude sur les facteurs de risque chez les bovins…… 82
III.1.3.11. Analyse en correspondances multiples…… 83
III.2. Étude histopathologique…… 84
III.2.1. Lésions placentaires…… 84
III.2.1.1. Lésions macroscopiques…… 84
III.2.1.2. Lésions histopathologiques…… 85
III.2.2. Lésions fœtales…… 85
III.2.2.1. Lésions macroscopiques…… 85
III.2.2.2. Lésions histopathologiques…… 85
III.2.2.2.1. Lésions cérébrales…… 85
III.2.2.2.2. Lésions myocardiques…… 87
III.2.2.2.3. Lésions musculaires…… 87
III.2.2.2.4. Lésions hépatiques…… 89
IV. Discussion…… 90
IV.1. Effectifs…… 90
IV.2. Tests utilisés…… 90
IV.3. Étude Séro-épidemiologique…… 91
IV.3.1. Séroprévalence…… 91
IV.3.2. Étude cas-témoin : avortements et séropositivité à *N. caninum*…… 93
IV.3.3. Étude des facteurs de risque…… 95
IV.3.3.1 Présence de chiens…… 95
IV.3.3.2. Avortement…… 96
IV.3.3.3. Age…… 96
IV.3.3.4. Parité…… 97
IV.3.3.5. Couleur de la robe…… 97
IV. 3.3.6. Stade de gestation…… 98
IV.3.3.7. État d'hygiène des fermes…… 98
IV.3.3.8. Région…… 99
IV.3.3.9. Saison…… 99
IV.4. Etude histopathologique…… 100
V .Conclusion et recommandations…… 104
VI.Référence bibliographique…… 105

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques structurelles et morphologiques des stades de *N. caninum* ….. **20**

Tableau 2 : Séroprévalence des anticorps anti-*N. caninum* depuis 2016……... **48**

Tableau 3 : Séroprévalence des anticorps anti-N. *caninum* en Algérie…… **49**

Tableau 4 : Facteurs de risques liés à l'infection à *N. caninum*…… **62**

Tableau 5 : Caractéristiques des fermes……... **76**

Tableau 6 : Séroprévalence en fonction du statut des fermes……... **77**

Tableau 7 : Association entre la séroprévalence et les avortements au niveau des fermes… **77**

Tableau 8 : Association entre la séroprévalence et les avortements au niveau individuel... **78**

Tableau 9 : Séroprévalence en fonction de la présence de chiens…… **78**

Tableau10 : Séroprévalence en fonction de l'avortement de la vache……... **78**

Tableau11 : Séroprévalence en fonction de la classe d'âge…….. **79**

Tableau12 : Répartition de la séroprévalence en fonction de la parité…….. **79**

Tableau13 : Répartition de la séroprévalence en fonction de la couleur de la robe…….. **80**

Tableau14 : Répartition de la séroprévalence en fonction du stade de gestation……. **80**

Tableau15 : Effet de l'état d'hygiène sur de la séropositivité……... **80**

Tableau16 : Répartition de la séroprévalence en fonction de la région……. **82**

Tableau17 : Effet de la saison sur la séropositivité……... **82**

Tableau18 : Facteurs de risque associés à la séropositivité à *Neospora caninum*……. **78**

Tableau19 : Localisation des lésions microscopiques des 6 foetus bovins……... **84**

Liste des figures

Figure 1 : Répartition géographique des différents types du bovin local en Algérie…….. **3**

Figure 2 : Variétés de la brune de l'Atlas……... **4**

Figure 3 : Mécanisme d'invasion cellulaire par un tachyzoïte de *N. caninum*…… **8**

Figure 4 : Classification taxonomique de *Neospora c*es principales caractéristiques de chaque niveau organisationnel……... **18**

Figure 5 : Schéma du tachyzoïte de *N. caninum* ……... **21**

Figure 6 : Stades de *N. caninum* …… **22**

Figure 7 : Cycle de vie de *N. caninum*…….. **24**

Figure 8 : Transmission de *N. caninum*……... **26**

Figure 9 : Réponses hypothétiques des anticorps après infection par *N. caninum*…… **47**

Figure 10 : Répartition géographique des fermes ayant fait l'objet de visite et de prélèvements… **60**

Figure 11 : Composition de la trousse ELISA *N. caninum* IDvet……... **63**

Figure 12 : Préparation des sérums……. **63**

Figure 13 : Distribution de tampon de dilution 2 (a) et transferts des sérums dans la microplaque ELISA **(**b)…….. **63**

Figure 14 : Lavage et séchage de la microplaque ELISA…… **64**

Figure 15 : Dilution (a) et distribution du conjugué (b)……..….. **64**

Figure 16 : Microplaque ELISA durant (a) et après la distribution (b) de la solution d'arrêt…… **65**

Figure 17 : Lecteur de plaque automatique (PerkinElmer, Waltham, USA……. **65**

Figure 18 : Localisation de la wilaya de Souk Ahras en Algérie……..... **66**

Figure 19 : Plan de l'abattoir pour bétail de Souk ahras……... **67**

Figure 20 : Matériels technique……..... **68**

Figure 21 : Examen macroscopique externe de l'appareil génital…… **68**

Figure 22 : Fœtus en décubitus latéral pour la détermination de la longueur couronne-croupe….. **69**

Figure 23 : Prélèvements du cerveau et des organes fœtales……... **69**

Figure 24 : Automate de déshydratation et inclusion en paraffine……..... **70**

Figure 25 : Appareil de moulage des pièces dans la paraffine (Thermo Scientific, Histo Star™) **71**

Figure 26 : Pièces dans les blocs de paraffine après inclusion……. **71**

Figure 27 : Microtome (a), Ruban obtenu par microtomie(b) et Bain d'eau thermostaté(c)……. **72**

Figure 28 : Automate de coloration *(*Thermo Scientific, Varistain 24-4, Cedex, France*)*…….. **73**

Figure 29 : Lames histologiques apés étalement et coloration en hématoxyline-éosine…… **73**

Figure 30 : Observation microscopique des lames histologiques…… **74**

Figure 31 : Pourcentage des Fermes séropositives et séronégatives……..... **75**

Figure 32 : Pourcentage des vaches séropositives et séronégatives…… **75**

Liste des figures

Figure 33 : Nombre de sérums positifs en fonction du pourcentage de positivité…… **76**

Figure 34 : **Po**urcentages de séropositifs et de séronégatifs en fonction de l'état d'hygiène…… **81**

Figure 35 : Séroprévalence en fonction de la région…….. **81**

Figure 36 : Analyse en correspondances multiples (MCA) des facteurs associés à la séroprévalence vis à vis de *N. caninum*…….. **83**

Figure 37 : Structure similaire à un kyste tissulaire a bradyzoïte de *Neospora caninum* dans le tissu placentaire du foetus n° 22……. **85**

Figure 38 : Lésion inflammatoire avec point central de nécrose dans le cerveau du foetus n°2 … **86**

Figure 39 : Structure semblable à un kyste tissulaire à bradyzoïte de *N. caninum* dans le cerveau du foetus n° 7……. **86**

Figure 40 : Structure semblable à un kyste de *N. caninum* dans le cerveau du foetus n° 11…….. **86**

Figure 41 : Structure similaire à un kyste de *N. caninum* dans le myocarde du foetus n° 11…… **87**

Figure 42 : Structure rappelant un kyste de *N. caninum* dans le myocarde du foetus n° 5…….. **87**

Figure 43 : Structure similaire à un kyste de *N. caninum* dans le muscle squelettique du fœtus n°5 **88**

Figure 44 : Structure similaire à un kyste de *N. caninum* dans le muscle squelettique du foetus n°9 **88**

Figure 45 : Lésion inflammatoire avec infiltration par des cellules mononuclées*(Flèche)* et présence d'une structure semblable à un kyste tissulaire de *Neospora caninum* dans le muscle squelettique*(Cercle)* du foetus n° 11……. **88**

Figure 46 : Résultats histopathologiques du foie du foetus n °2 : Structure semblable à un kyste tissulaire (Cercle) avec infiltration par des cellules mononucléaires…… **89**

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
BLM	Bovins laitiers modernes
BLA	Bovins laitiers améliorés
BLL	Bovins laitiers locaux
BVD	Diarrhée virale bovine
Cn :	Contrôle négatif
Cp :	Contrôle positif
DO :	Densités optiques
DO :	Densité optique
DSA :	Direction des services agricoles
E :	Est
E. coli :	*Escherichia coli*
ELISA :	Enzyme-Linked Immuno Assay
G :	Grossissement
GPI :	glycosylphosphatidylinositol
GRA :	Protéines des granulaires denses
HD :	Hôte définitif
HI :	Hôte intermédiaire
HRP :	Horseradish peroxidase ou peroxydase de raifort
IA :	Insémination artificielle
IBR :	Rhinotrachéite bovine
IC :	Intervalle de confiance
IFAT :	Indirect fluorescence antibody *test*
IFNα :	Interféron alpha
IFN-γ :	Interféron gamma
Ig :	Immunoglobuline
IHC :	Immunohistochimie
ISCOM :	Complexes immunostimulants
ITS :	Espaceur interne transcrit ou Internal transcribed spacer
kDa :	kilodalton
LCR :	Liquide céphalo-rachidien
MIC :	Protéines des micronèmes
mn :	Minute
N :	Nord
NAT :	Test d'agglutination Neospora
Nc :	*Neospora caninum*
NcBRS	Antigènes spécifiques des bradyzoïtesde *N. caninum*
NcDG2	Antigènes de granules denses de *N. caninum*
NcSRS2 :	Antigène de surface de *N. caninum*
NEC :	Note de l'état corporel
Nég :	Négatif

Liste des abréviations

NK	Cellules natural killer
OR :	Odds ratio
P :	Probabilité
PCR :	Polymerase chain reaction
Pos :	Positif
RON et ROP :	Protéines des rhoptries
SAG1 :	Surface Antigen *1* Protéine.
Séro. pré :	Séroprévalence
SRS :	SAG1-related sequences
T :	*Toxoplasma*
Taq :	ADN polymérases thermostables
Tg :	Toxoplasma gondii
TgMAG1	Antigène matriciel *Toxoplasma gondii*
TgMIC,	Protéine micronème de *Toxoplasma gondii*
TMB :	Tétraméthylbenzidine
TNFα :	Tumor Necrosis Factor
USA :	United States of America
WB :	Western blot
X2 :	Chi deux

Introduction

En matière de productions animales, les systèmes d'élevage bovin pratiqués actuellement en Algérie sont caractérisés par un niveau faible de productivité pouvant être expliquée essentiellement par les contraintes génétiques, alimentaires et sanitaires . Le faible potentiel génétique des races locales et les sorties de devises pour l'importation du lait et des produits laitiers ont contraint beaucoup notre pays à accroître la production laitière nationale. Ainsi, l'amélioration de la fertilité demeure un des objectifs prioritaires pour optimiser le potentiel de reproduction et donc de production de l'élevage bovin. Selon le ministère de l'agriculture, l'élevage bovin est localisé principalement dans le Tel et les hautes plaines ***(BOURAS, 2015).*** La population bovine locale représente plus de la moitié du cheptel national alors que les races importées et celles issues de croisement avec le bovin local représentent le reste du bovin. La répartition nationale totale du bovin local en Algérie est la suivante : environ 59 % dans le Nord-Est ; 22 % au Centre ; 14% au Nord-Ouest et 5% dans le Sud ***(ANGR, 2003)***. Malgré son importance en termes d'effectifs, sa participation aux productions animales et sa rusticité ne suscitent aucun intérêt ni che les scientifiques, ni chez les pouvoirs publics. En pratique, les politiques de développement de l'élevage bovin en Algérie ont opté pour un système d'intensification de la production laitière locale par l'entremise d'un vaste programme d'amélioration génétique du cheptel autochtone grâce notamment à la biotechnologie de l'insémination artificielle (IA). Malheureusement, l'analyse des résultats sur l'insémination artificielle en Algérie a montré une faiblesse des taux de réussite à la première insémination de l'ordre de 22% (***ACHEMAOUI et BENDAHMANE, 2016).*** Plusieurs facteurs sont à l'origine de ces faibles taux d'IA ; notamment la non maîtrise des paramètres de la reproduction chez la vache, l'alimentation et surtout les mortalités embryonnaires et les avortements. Ces derniers occasionnent des pertes économiques sévères, ayant à la fois des effets directs sur les animaux (pertes de veaux, stérilité, augmentation des intervalles entre vêlages, diminution de la production laitière) et des effets indirects sur les productions animales tels que le coût des interventions vétérinaires et de la reconstitution des cheptels ***(REKIKI et al., 2005).*** Ainsi, pour une meilleure rentabilité économique de l'élevage local et de l'intensification de la production, la connaissance des causes des avortements et les méthodes de diagnostic constituent le meilleur moyen pour maîtriser nos élevages bovins locaux. *Neospora caninum* est l'un des organismes infectieux les plus répandus dans le monde, il est considéré comme un agent abortif majeur chez le bovin**.** Il explique entre 20 et 30 % des avortements, soit l'unique responsable ou associé à d'autres pathogènes ; d'autre part les vaches séropositives peuvent avoir entre 3 et 5 fois plus de risque

d'avorter que les femelles séronégatives ***(LAGOMARSINO et al. 2019).*** Malgré les quelques études menées dans nos régions, la situation épidémiologique de la néosporose bovine au Maghreb reste peu connue. En Algérie une séroprévalence de 19,6 % a été obtenue (157/799 bovins importés, améliorés et locaux) dans trois régions du Centre-Nord algérien (***GHALMI et al., 2012),*** de 12,4% (23/186 bovins laitiers) dans cinq régions du Centre- Nord algérien ***(ACHOUR et al 2012)*** et de 15% (54/306 vaches) dans la région d'Alger ***(DERDOUR et al., 2017). GHALMI et al. 2012*** ont étudiés aussi l'impact de *Neospora caninum* comme agent abortif chez différentes populations bovines en Algérie. L'étude a montré globalement que la présence de bovins séropositifs vis-à-vis de *N. caninum* dans les fermes était un facteur de risque d'avortement. Cependant, la situation considérée au niveau des populations a fait ressortir une association significative entre la séropositivité à *N. caninum* et les avortements pour les populations des BLM et celles des BLA alors que la situation des BLL était particulière puisque bien que ce soit la population qui ait montré la plus grande séroprévalence (34%), aucune association avec les avortements n'a pu être mise en évidence. Ils ont émis alors l'hypothèse que le bovin local pourrait résister naturellement non pas à l'infection par *N. caninum* mais à son effet abortif**.** A l'heure actuelle, aucune donnée n'existe sur la présence ou non de *N. caninum* chez le bovin de race locale « Brun de l'Atlas » dans la région du Nord-Est algérien. Pour évaluer l'impact de l'infection par *N. caninum* chez la vache gestante de population locale dans cette région et afin de vérifier l'hypothèse de résistance aux avortements chez cette population bovine (***GHALMI et al., 2012)***, nous avons adopté une stratégie qui a consisté à scinder notre étude en 2 parties. Une première partie s'interesse à une étude séroépidémiologique de l'infection par *N. caninum* chez la vache gestante de race locale pour cela des vaches gestantes de la population bovine locale ont été prélevées au niveau de cinq régions différentest du Nord- Est du pays pour déterminer leurs statut sérologique vis-à-vis de *N. caninum.* Une Étude épidémiologique de type cas-témoin pour vérifier l'existence d'un éventuel lien causal entre la présence d'anticorps dirigés contre *N. caninum* et les avortements et l'étude de quelques facteurs de risque potentiels favorisant cette infection . La 2ème partie de cette thèse a été consacrée à une étude histopathologique sur des tissus placentaires et fœtaux issus de vaches seropositives gestantes abattues dans l'abattoir communal de Souk Ahras, afin de vérifier l'existence et l'importance de la transmission transplacentaire. Le but était aussi d'évaluer l'ampleur des lésions et la distribution de *N. caninum* dans des tissus fœtaux issus de vaches infectées naturellement.

Étude des avortements et des lésions fœtales induits par *Neospora caninum* chez la race bovine locale infectée naturellement

Revue de la littérature

Thèse de doctorat **ABDELTIF Besma**

Revue de la littérature

I. Aperçu sur le bovin local en Algérie

Le cheptel bovin national est constitué de la population bovine autochtone/locale, de la population bovine croisée (produit du croisement d'absorption) et des races spécialisées ou pures. La population locale est constituée par la « Brune de l'Atlas » qui est conservée par des croisements internes ***(ANGR, 2003)***. La brune de l'Atlas a acquis d'autres appellations telles que : Beldi; Mahalli blonde des Plateaux; d'Oulmes et des Zaers; Oulmes Blond, Oulmes, Blond Moroccan, Blond Zaers, Moroccan Blond; Libyan Brown Atlas, Libyan Shorthorn ***(BENYAROU, 2016).*** La Brune de l'Atlas se répartit tout au long du complexe montagneux désigné sous le nom d'Atlas qui s'étend en Tunisie, en Algérie et au Maroc. L'altitude des chaines et des hauts plateaux varie de 900 à 4000 mètres ***(JOSHI et al, 1957).*** En Algérie, le bovin local est à 80% localisé au nord de l'Algérie ***(Figure 1),*** avec une prédominance à l'Est 50% réparti entre Guelma, El-Tarf, Annaba, Jijel, Sétif et Biskra, 27% au Centre et 23% à l'Ouest ***(LAIDI, 2015)*** avec une prédominance du sexe femelle (***(BENYAROU, 2016).***

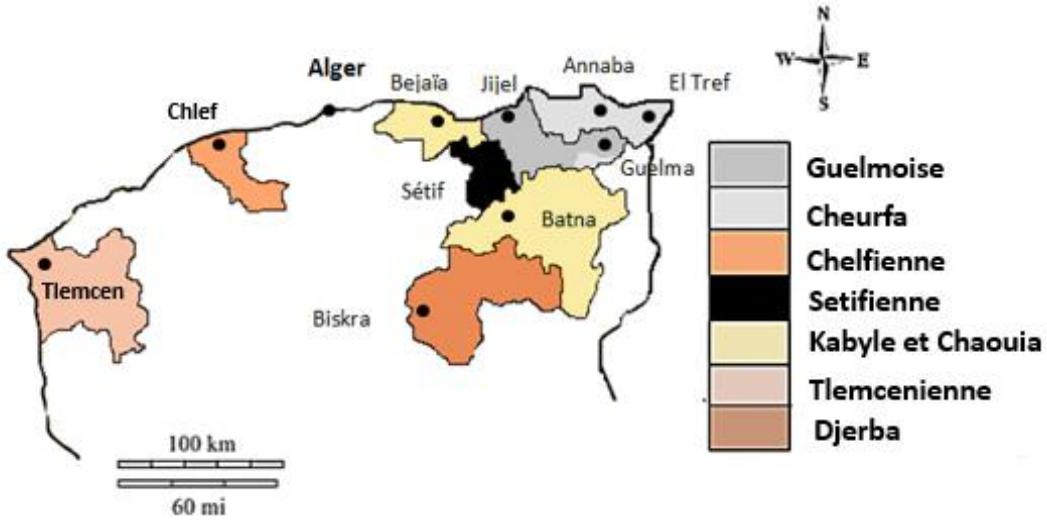


Figure 1 : Répartition géographique des différents types du bovin local en Algérie ***(ABDELTIF , 2014)***

Il est de petit format (250- 300 kg) et une robe grise ou allante du fauve brunâtre au rouge-brun mais le croisement avec des races européennes (pie-rouge, pie-noire) a largement influencée le phénotype de la population d'où l'apparition d'autres robes hétérogènes ***(MOULA et al, 2012).*** Il s'agit d'un animal brachycéphale présentant les caractéristiques phénotypiques suivantes ***(ZEMMOUCHI F., 2009)*** : le pelage de la robe nuancée allant du fauve brunâtre au rouge-brun et au gris foncé, peau relativement fine, poils courts, muqueuses brunes à ardoisées, paupières et mufle souvent noirs. Sur la tête , il y a la présence de chignon, profil droit ou subconcave, front déprimé, face triangulaire ou allongée, orbites saillantes,

cornes fines en crochets avec extrémité pointue de couleur grise ou noire. Le Corps est de petite taille, musculature moyenne, fanon très développé, hanche étroite, dos horizontal, queue longue. Les membres frêles et courts, onglons noirs à cornes très dures et solides. Les Mamelles peu volumineuses, trayons petits. La « brune de l'atlas » a subi des modifications suivant le milieu dans lequel elle vit ; elle a donné naissance à des « variétés », telles que la Guelmoise, la Cheurfa, la Sétifienne, la Chélfienne, la Kabyle, la Tlemcénienne et la Djerba ***(ITEBO, 1997).*** La Guelmoise ***(Figure 2a)*** a un pelage gris et vit en zones forestières, sa taille est de 1,45 m et le tour spiral est de 1, 90 m; tandis que la longueur totale moyenne est de 1,18 m. Il n'existe pas de différences avec la Cheurfa sauf qu'elle apparaisse plus grande ***(RAHAL et al., 2013).*** Elle a été identifiée dans les régions de Guelma et de Jijel et compose la majorité du cheptel bovin algérien ***(ZEMMOUCHI, 2009).***

a : Guelmoise

b : setifienne

c : Cheurfa

d : Chélfienne

Figure 2 : Variétés de la brune de l'atlas ***(ABDELTIF, 2014).***

La Sétifienne ***(Figure 2b)*** a une robe uniforme de couleur noirâtre, une bonne conformation, une taille et un poids très variables selon la région où elle vit. La queue est de couleur noire, longue, traînant parfois sur le sol et la ligne raie de mulet en sont les caractéristiques de cette sous race. Elle se trouve au niveau de la région de Sétif. La Cheurfa ***(Figure 2c)*** vit en bordure des forêts, identifiée dans les zones lacustres et littorales d'El-Tarf et d'Annaba où se situe la majorité de l'effectif. Elle est présente à Jijel et couvre le sud de Guelma. Elle présente une

robe à pelage gris clair (presque blanchâtre) au clair presque blanc (blanc laiteux). Le mufle et les paupières sont toujours noirs. La peau est fine et souple avec des poils courts. La Chélfienne ***(Figure 2d)*** a une robe fauve, une tête courte, des cornes en crochets, des orbites saillantes entourées de lunettes marron foncé, la queue est noire et longue et touche le sol. La variété Djerba peuple la région de Biskra. La robe est brune foncée, la tête étroite, la croupe arrondie, la queue longue. La taille très réduite est caractéristique de l'adaptation en milieu très difficile du sud . La variété kabyle et chaouia s'apparentent respectivement à la population Guelmoise-Cheurfa ***(FELIACHI, 2003)***. La variété Tlemcenienne subie des croisements avec une race ibérique. Elle est localisée dans les montagnes de Tlemcen et de Saïda ***(BENYAROU, 2016).*** Tous les auteurs s'accordent pour dire que les aptitudes laitières de la Brune de l'Atlas sont faibles. La production laitière de la population locale se situe entre 4 à 5 litres par vache par jour et la durée de lactation est de 175 jours ***(LAIDI, 2015).*** La production laitière journalière des vaches locales du type Guelmoise et Cheurfa conduites rationnellement est de 7 litres par vache avec un minimum de 6.1 litres et un maximum de 9.1 litres ***(SADELER, 1931)***. La vache locale présente une courbe de lactation d'allure identique à celle des fortes productrices de lait***.*** La phase ascendante est brève. La production de lait augmente pendant les premières semaines qui suivent la mise bas. Le maximum de production laitière est obtenu entre la deuxième et la sixième semaine suivant la mise bas. La phase descendante est longue, la production laitière diminue d'une manière plus ou moins régulière jusqu'au tarissement ***(LAIDI, 2015)***. Par contre ***AMRANE (1987)*** note que le maximum de production laitière est enregistré dans les deux mois qui suivent la parturition. Malgré que les aptitudes de la Brune de l'Atlas dans la production de viande soient moyennes, elle demeure toujours exploitée pour sa viande dans plusieurs régions de l'Algérie, celle-ci s'engraisse bien au pâturage ***(JOSHI et al, 1957). SADELER (1931)*** rapporte que même durant la période où le bovin local est gras, c'est-à-dire d'avril à juillet, la graisse interstitielle donne une saveur et une tendreté à la viande. Le même auteur ajoute que pendant les mois de disette, le bovin local subit une maigreur sévère. Cependant, dés les mois de mars-avril, les animaux augmentent de poids ; la graisse de couverture et la graisse viscérale apparaissent vite ce qui explique la considérable faculté d'assimilation de la race. ***BOUZEBDA (2007),*** rapporte un rendement en viande de 48% pour un bœuf. Selon plusieurs auteurs si les bœufs sont abattus au bon moment, leur rendement serait de 45 à 50% ***(BNEDER, 1978 ; BOULAHBEL, 1999).*** En élevage bovin local, les saillies, vêlages et tarissements s'effectuent d'une façon naturelle, sans aucune intervention de l'éleveur. Les taureaux reproducteurs au niveau des exploitations sont présents toute l'année avec les vaches. Le délai des saillies depuis l'apparition des chaleurs n'est

généralement pas connu. Le taureau étant en permanence dans le troupeau, dés qu'une vache manifeste ses chaleurs elle est alors fécondée. Pour les éleveurs n'ayant pas de reproducteur, ce délai varie d'une heure (si le mâle se trouve dans un troupeau voisin) à plus d'une journée (dans le cas où la vache est en chaleur vers la fin de la journée) ***(BENCHAAR, 1987).*** Pour certains éleveurs, la première saillie est en général non fécondante, cette situation est liée à la nature physiologique de la vache. Pour d'autres, c'est plutôt l'effet du poids et de l'âge de la vache (généralement une maigreur prononcée chez la femelle influence négativement la réussite de la saillie) et également le taureau (la première saillie ne réussit pas généralement avec un taurillon mal entrainé). La réussite de la première saillie dépend beaucoup plus de la saison, les saillies fécondantes sont par conséquent regroupées en Mars-Avril, période où l'alimentation est abondante ***(BENCHAAR, 1987).*** Selon le même auteur, la première saillie se fait généralement à l'âge de 2 à 3 ans avec une moyenne de 30 mois. L'âge au premier vêlage est compris entre 3 et 4 ans. Pour effecteur la première saillie, l'éleveur ne prend en compte ni l'âge ni le poids de la génisse « l'essentiel est l'obtention d'un veau dès que la vache est apte pour être fécondée». Les vêlages s'étalent sur toute l'année. L'écart entre vêlage dépend en grande partie de l'écart vêlage-saillie fécondante, il varie entre un ou deux ans et est en moyenne de dix-huit mois ***(YACHEUR, 1986***). Cet écart élevé s'explique par le mauvais ou l'absence de détection des chaleurs et les échecs multiples des saillies après les vêlages. Chez les éleveurs des montagnes, les vêlages interviennent en majorité en plein air en forêt, sans aucune intervention de l'éleveur.

II. *Neospora caninum* et la néosporose

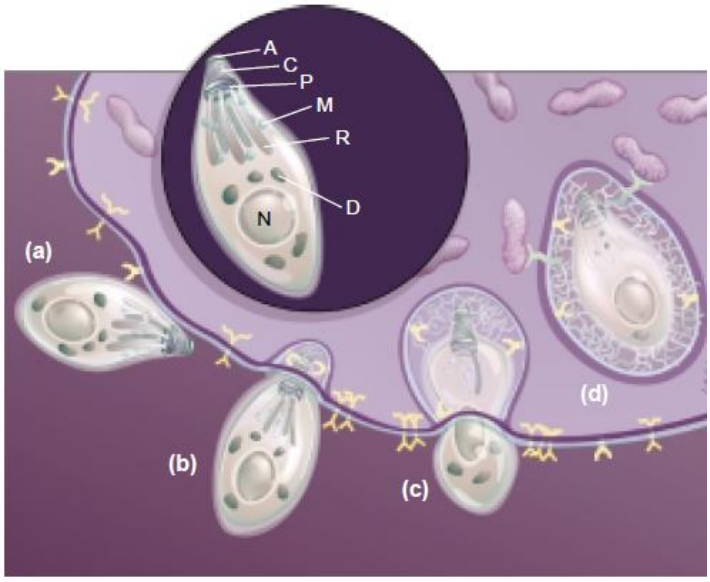
II.1. Introduction

La néosporose est une maladie parasitaire causée par *Neospora caninum*, un protozoaire intracellulaire obligatoire appartenant au phylum Apicomplexa ***(DUBEY et al., 1988a)***, proche de *Toxoplasma gondii* avec lequel, il présente de nombreuses similitudes ***(KAMGA WALADJO et al, 2008)***. Les parasites apicomplexes ont été caractérisés par un complexe apical situé à une extrémité de leur structure. Le complexe apical est important en tant qu'adaptatif évolutif unique pour l'invasion des cellules hôtes ***(GOODSWEN et al., 2013).*** *N. caninum* provoque la néosporose chez les bovins (*Bos taurus*) et les chiens domestiques (*Canis familiaris*). Il s'agit d'une cause majeure d'avortement chez les bovins et aussi à l'origine d'une maladie neuromusculaire chez le chien infecté. Elle a été trouvée chez les bovins dans tous les pays où la maladie a été recherchée ***(AL-QASSAB et al., 2010).***

II.2. Pathogénie

Lors d'une primo-infection d'une vache résultant de l'ingestion d'oocystes de *N. caninum* sporulés, les oocystes libèrent huit sporozoïtes dans l'intestin grêle comme dans la toxoplasmose ovine ***(BUXTON, 1998).*** Les sporozoïtes parasitent alors l'épithélium intestinal, se transforment en tachyzoïtes et subissent une phase de multiplication dans les ganglions lymphatiques mésentériques. De là, les tachyzoïtes sont libérés dans le sang ***(DUBEY et al. 2006). OKEOMA et al. (2004a)*** ont démontré la présence de l'ADN de *N. caninum* dans la fraction leucocytaire de sang de bovins naturellement infectés. La parasitémie conduit à la dissémination dans tout le corps, y compris l'utérus gravide. Expérimentalement, la parasitémie est difficile à détecter, probablement parce qu'elle est de courte durée ou pulsatile, ou les deux ***(MALEY et al., 2003 ; MACALDOWIE et al., 2004).*** La transmission transplacentaire endogène de *N. caninum* est le mode d'infection le plus courant chez les bovins ***(BJÖKMAN et al., 1996 ; ANDERSON et al., 1997).*** Les vaches séropositives sont plus susceptibles que ceux qui sont séronégatives d'avorter ***(THURMOND et al., 1997 ; MOEN et al., 1998 ; WOUDA et al., 1998 ; DAVISON et al., 1999a).*** Chez les bovins infectés de façon chronique, *N. caninum* est enkysté sous forme de kyste à bradyzoïtes, principalement dans le système nerveux central (SNC) et dans le muscle squelettique ***(HO et al., 1997 ; SAWADA et al., 2000 ; PETERS et al., 2001 ; SCHARES ET al., 2001, OKEOMA et al., 2004b)***. La réactivation d'une infection chronique est éventuellement déclenchée par une baisse de l'immunité à médiation cellulaire au milieu de la gestation ***(INNES et al., 2001, 2002, 2005).*** Les tachyzoïtes, alors de nouveau en dispersion, vont se diriger notamment vers le placenta et passer la barrière pour contaminer le foetus. L'invasion cellulaire est un élément clé et les processus complexes impliqués semblent être similaires chez les autres espèces Apicomplexa. Une première phase concerne la reconnaissance et l'attachement du parasite à sa cellule hôte grâce à des récepteurs et des protéines libérées par les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. L'attachement se produit sans aucune orientation cohérente ***(HEMPHILL et al, 1996)*** et implique des antigènes de surface immunodominants tels que *N. caninum* SAG-related sequence 2 (NcSRS2) ***(HEMPHILL, 1996)***. La deuxième phase se rapporte à l'invasion active du parasite et la troisième étape se rapporte à la formation de vacuole parasitophore et son développement intracellulaire. Le conoïde provoque l'invagination de la membrane plasmique et diverses protéines sont alors émises dans la vacuole parasitophore ainsi formée ***(Figure 3)***. Il existe une zone d'attachement entre la membrane externe du parasite et la membrane plasmique de l'hôte par l'intermédiaire des adhésines synthétisées par les micronèmes. Le parasite rentre progressivement dans la cellule

par glissement et se retrouve finalement entièrement dans la vacuole parasitophore ***(BUXTON et al., 2002).*** Cette pénétration active dans la cellule-hôte dure après au moins cinq minutes de contact ***(HEMPHILL et al.,1996),*** le tachyzoïte s'entoure d'une vacuole parasitophore où il se multiplie par endodyogénie. La vacuole parasitophore est formée à partir de la membrane de surface de la cellule hôte et est modifiée par le parasite peu après l'invasion ***(RETTIGNER et al., 2004).*** Chez l'animal infecté, les tachyzoïtes se retrouvent dans de nombreux types de cellules : cellules nerveuses, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales vasculaires, myocytes, cellules rénales tubulaires et hépatocytes ***(DUBEY et LINDSAY, 1996)***. Les tachyzoïtes peuvent être très nombreux par cellule et l'on peut observer jusqu'à 100 tachyzoites dans un seul plan de coupe. Ce phénomène multiplicatif conduit à la mort cellulaire et a l'invasion rapide des cellules voisines ***(DUBEY et LINDSAY, 1996 ; SPEER et al., 1999).*** Les conséquences de l'infection chez la vache vont dépendre du statut immunitaire de la vache, le stade physiologique de la vache (gestante ou pas), de l'âge du foetus au moment de l'infection ***(INNES et al., 2002).*** Elles peuvent aller de l'avortement, à la naissance d'un veau malformé, ou d'un veau normal mais infecté chroniquement par le parasite ***(DUBEY et LINDSAY, 1996).***



A : anneau apical, *N : nucleus,* *a :Fixation du tachyzoïte à la cellule sans orientation particulière,*
C : conoïde, *P : anneau polaire,* *b :Invasion par le conoïde et libération du contenu des organelles,*
D : granules denses, *R : rhoptries* *c :Pénétration du tachyzoïte à l'intérieur de la cellule,*
M : micronème, *d :Création d'une vacuole parasitophore.*

Figure 3 : Mécanisme d'invasion cellulaire par un tachyzoïte de *N. caninum* ***(BUXTON et al., 2002)***

II.3. Réponse immunitaire à *N. caninum* chez les bovins

Après une exposition à *N. caninum,* les bovins développent une immunité cellulaire et humorale, des réponses qui n'offrent qu'une protection partielle contre le parasite ***(GUIDO, 2017).*** L'élimination du parasite des bovins infectés est considérée comme peu probable, voire impossible, et les vaches infectées ont un plus grand risque d'avortement que les vaches non infectées ***(LOPEZ- GATIUS et al. 2004a ; WESTON et al., 2005).*** Les réponses immunitaires à médiation cellulaire devraient jouer un rôle majeur dans le contrôle de l'infection et dans la réduction de la charge parasitaire chez l'hôte vue la nature intracellulaire obligatoire de *N. caninum* ***(INNES et al., 2005 ; GHALMI, 2011a).*** Les premières études réalisées sur des souris ont montré la prédominance d'une réaction de type Th1, faisant intervenir l'interleukine 12, l'interféron gamma produit par les lymphocytes T (CD4+) et le facteur TNFα (Tumor Necrosis Factor) (***DUBEY, 1999b***). Ces derniers inhibent la multiplication intracellulaire du parasite sous sa forme tachyzoïte ***(INNES et al., 2000).*** Des essais sur des vaches non-gravides inoculées avec des tachyzoïtes, ont permis d'établir la présence d'une prolifération lymphocytaire et une production d'interféron gamma ***(ANDERSON et al., 2000).***

II.3.1. Réponses immunitaires des bovins non gestants

La plupart des bovins adultes sont capables de lutter contre l'infection et demeurent cliniquement normaux bien que toujours infectés. Le bovin adulte non gestant infecté par *N. caninum* va répondre en produisant des anticorps spécifiques, souvent utilisés comme aide au diagnostic, les tachyzoïtes sont source d'antigènes utilisés au diagnostic. L'efficacité des anticorps pour le développement d'une immunité reste à déterminer, mais ils jouent un rôle dans le contrôle de la parasitémie en répondant au stade extracellulaire du parasite ***(HEMPHILL et al., 2000).*** La production d'anticorps spécifiques est détectable une semaine après l'infection et les titres d'anticorps circulants restent élevés durant une longue période. L'avidité des anticorps spécifiques s'accroît dès la 2ème semaine après l'infection et ceci jusqu'à la 12ème semaine moment où les valeurs atteignent un plateau ***(MALEY el al., 2001)***. Dans le cas de l'infection expérimentale par des oocystes, une réponse proliférative spécifique est détectable une semaine après l'infection tandis que la production d'IgG1 et IgG2 apparaît 2 à 4 semaines après l'infection ***(DE MAREZ et al., 1999)***. Néanmoins, *N. caninum* est un parasite intracellulaire obligatoire et ne peut se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule hôte ***(HEMPHILL et al, 2000).*** La localisation intracellulaire implique que la réponse immunitaire à médiation cellulaire est probablement un mécanisme de protection important (prolifération cellulaire et production de cytokines). Elle est suffisante pour que l'animal ne développe pas de symptômes cliniques. La production d'interféron gamma (IFN-γ) par les lymphocytes T

CD4+ est capable de limiter la multiplication intracellulaire du parasite et joue ainsi un rôle important dans la protection immunitaire**.** Le parasite persiste cependant sous forme bradyzoïte, dans le système nerveux principalement. La preuve de l'importance de l'immunité à médiation cellulaire a été apporté par des études *in vitro* montrant que le traitement des cellules par de l'IFN gamma recombinant inhibe la multiplication intracellulaire de *N. caninum* ***(INNES et al., 1995).*** Chez des bovins infectés expérimentalement par des tachyzoïtes de *N. caninum,* les cellules mononuclées du sang périphériques produisent également de l'INF gamma. Le surnagent collecté à partir de cellules T CD4+ répondant aux antigènes de *N. caninum* a été utilisé pour traiter des cellules avant une infection *in vitro* par des tachyzoïtes de *N. caninum.* Le surnagent qui présente la plus forte concentration en IFN gamma est le plus efficace dans l'inhibition de la multiplication du parasite. Néanmoins, dans cette même étude, la neutralisation de l'IFN gamma produit par le surnageant n'annule pas complètement l'activité antiparasitaire. Ceci suggère que d'autres cytokines du surnagent sont également en mesure d'inhiber la multiplication intracellulaire du parasite ***(HEMPHILL et al., 2000).*** En résumé, l'étude de la réponse immunitaire après infection expérimentale par *N. caninum* de bovins montre que les réponses humorale et cellulaire sont toutes deux sollicitées par l'infection. Les expériences *in vitro* qui permettent la mesure de la multiplication du parasite ont montré l'importance de l'immunité à médiation cellulaire et en particulier de l'IFN gamma dans le contrôle de la croissance de *N. caninum* chez l'hôte. La même cytokine est également très importante dans la résistance à *Toxoplasma gondii* ***(HEMPHILL et al, 2000).***

II.3.2. Réponses immunitaires les bovins gestants

Les réponses immunitaires maternelles contre *N. caninum* chez les bovins gravides ont été largement étudiées, utilisant à la fois des études d'infections expérimentales et naturelles. Des études ont démontré l'importance de la réponse à médiation cellulaire lymphoprolifération et la production d'IFN-γ dans l'immunité protectrice contre *Neospora* ***(WILLIAMS et al., 2000, ANDRIANARIVO et al., 2001, ROSBOTTOM et al., 2011).*** Au début de la gestation, la réponse immunitaire maternelle est essentielle pour déterminer l'issue de la maladie à la suite d'une infection primaire ou recrudescence d'une infection chronique à *N. caninum*. De fortes infiltrations de cellules T (CD3 +, CD4 +, gamma-delta (γ-δ)) et les cellules NK du placenta maternel étaient liées à la mort fœtale ***(CANTON et al., 2014b, MALEY et al., 2006).*** Ces cellules infiltrantes étaient également associées à des augmentations de l'expression des cytokines de type Th1 IL-12, IFN-γ et TNF-α à l'interface placentaire ***(CANTON et al., 2014a, ROSBOTTOM et al., 2008)*** provoquant une pathologie immunitaire grave et la mort du fœtus

(MACALDOWIE et al., 2004). Ces résultats ont été soutenus par ***GIBNEY et ses collaborateurs (2008),*** qui ont montré qu'une infection expérimentale avec les tachyzoïtes de *Neospora* en début de gestation chez les bovins a provoqué une nécrose épithéliale focale étendue et l'infiltration de cellules mononuclées au niveau du placenta, ce qui était associé à la mort fœtale ***(GIBNEY et al., 2008).*** Alors que les travaux de ***FLYNN et MARSHALL (2011)*** ont démontré que les macrophages de bovins infectés par *N. caninum* produisaient de l'IL-17 ainsi que de l'IFN-γ, et ont suggéré qu'une combinaison de ces deux cytokines pro-inflammatoires pourrait contribuer à l'immunopathologie observée au niveau de l'interface fœtale maternelle lors d'infection à *N. caninum* chez les bovins ***(FLYNN et MARSHALL, 2011).*** Au milieu de la gestation, on observe une modulation majeure du système immunitaire et surtout de la réponse IFN-γ. La réponse lymphoprolifération maternelle et IFN-γ contre les antigènes de *N. caninum* ont été détectés dans le sang périphérique et les ganglions lymphatiques périphériques de bovins gravides infectés expérimentalement. Cependant, le rétrocontrôle négatif exercé sur le système immunitaire par la gestation permettrait la réactivation du parasite quiescent dans le système nerveux. Lors de cette réactivation, le parasite serait à même de sortir de la forme kystique et d'envahir la circulation sanguine. L'environnement materno-fœtal, avec libération de cytokines régulatrices par les lymphocytes Th-2 serait de plus favorable à la prolifération du parasite, ainsi qu'à l'infection du placenta et du fœtus. Pour ***ALMERIA et collaborateurs (2003),*** la réponse de type Th-1 pro-inflammatoire primitive, serait suivie d'une réponse modératrice de type Th-2. Cette réponse de type Th-2 avec relargage de cytokine anti-inflammatoire préviendrait la perte fœtale induite par la réponse inflammatoire excessive, mais permettrait également la multiplication du parasite au sein de l'hôte et son passage à travers le placenta. Cette immunomodulation (réponse de type Th2) pourrait expliquer pourquoi les taux de la transmission verticale augmente au fur et à mesure que la gestation progresse, car elle peut permettre au parasite la recrudescence, conduisant à des infections fœtales. Cela peut aussi expliquer pourquoi de nombreux avortements bovins associés à *N. caninum* se produisent vers le 150ème jour de gestation ***(DUBEY, 1999a).*** Au milieu de la gestation, les conséquences d'une infection peuvent être la mort du fœtus et donc l'avortement, où la naissance d'un veau cliniquement atteint de néosporose. Les études expérimentales examinant les infections à *N. caninum* en fin de gestation chez les bovins sont limitées. Les données disponibles suggèrent que les primo-infections à ce stade de la gestation sont souvent associées à des taux élevés de transmission verticale, mais à de faibles taux de mortalité fœtale. ***ANDRIANARIVO et ses collaborateurs (2001)*** ont démontré une transmission verticale et une infection fœtale chez 5

vaches sur 5 infectées par *N. caninum* en fin de gestation (jours 219-231 de gestation) ***(ANDRIANARIVO et al., 2001).*** Alors que ***BENAVIDES et ses collaborateurs (2012),*** ont observé une transmission verticale chez tous les animaux infectés à partir de 28 ème jour post infection (jour 238 de gestation) ***(BENAVIDES et al., 2012)***. Des observations antérieures ont également montré que suite à une infection par *N. caninum* à la fin de gestation, la viabilité fœtale était expliquée par une nécrose placentaire minime, une légère infiltration inflammatoire et une réduction des niveaux d'expression de l'IFN-γ ***(GIBNEY et al., 2008, ROSBOTTOM et al., 2008).*** Ces conclusions ont été confirmées par les travaux de ***CANTON et de ses collaborateurs (2014 a , b)*** où ils ont montré que l'absence de mort fœtale était probablement due en partie à une légère infiltration cellulaire inflammatoire au niveau du placenta maternel ***(CANTON et al., 2014b)***, avec une production limitée de cytokines pro inflammatoires (IFN-γ) ***(CANTON et al., 2014a).*** Ce manque d'immunopathologie est probablement dû à l'environnement biaisé en Th2 au niveau du placenta, entraînant une réduction (suppression) des réponses pro-inflammatoires nocives (***RAGHUPATHY, 1997***). Cependant, le principal facteur qui réduira les taux de mortalité fœtale est la maturité croissante de la réponse immunitaire du fœtus contre *N. caninum* à mesure que la gestation progresse.

II..3.3. Réponses immunitaires fœtales bovines contre *Neospora caninum*

En raison de la nature épithélio-choriale du placenta ruminant, a l'état normal, il n'y a pas de facteurs immunitaires maternels (les cellules immunitaires, les anticorps et les cytokines) qui peuvent traverser l'interface mère-fœtus. Cela signifie que toute la réponse immunitaire observée est directement lié à une infection fœtale. Chez le foetus bovin sain normal, le développement du système immunitaire est observé à partir du 42ème jour de gestation, tandis que la rate est structurellement présente à partir du 60ème jour de gestation ***(SCHULTZ et al., 1973).*** A 3 mois de gestation, les monocytes et les lymphocytes T ont été montrés en grand nombre dans les échantillons de thymus et de rate des fœtus bovins. À la même période de la gestation (environ 90 jours), de faibles nombres de lymphocytes B ont également été identifiés. Ces derniers présentent une plus faible concentration car ils prolifèrent et se différencient principalement de manière dépendante de l'antigène ***(SENOGLES et al., 1979).*** Actuellement, la recherche s'est concentrée sur la capacité du fœtus à développer une réponse immunitaire efficace contre une infection à *N. caninum* et si oui, à quel stade de la gestation la réponse immunitaire fœtale devient protectrice ? Bien que les cellules immunitaires et les tissus lymphoïdes sont présentes au cours du premier trimestre de la gestation, les cellules immunitaires ne semblent pas capables de développer une réponse immunitaire protectrice

spécifique à l'antigène. Si la transmission verticale survienne au début de la gestation, le résultat sera probablement la mort du fœtus ***(ANDRIANARIVO et al., 2001, ROSBOTTOM et al., 2008).*** Au milieu de la gestation, la réponse immunitaire fœtale bovine est complètement développée. Entre 131-154 jours de gestation le fœtus s'est avéré capable de remontrer une réponse immunitaire spécifique à l'antigène ***(ALMERIA et al., 2003).*** Ces réponses sont dominées par les Cellules T CD4 + et production importante de cytokine IFN-γ (***ALMERIA et al., 2003, BARTLEY et al., 2004, ROJO-MONTEJO et al., 2009a***). Aussi à ce stade, les fœtus bovins sont également capables de développer des réponses immunitaires humorales contre *N. caninum*, qui sont prédominées par la production des anticorps IgG1***(ANDRIANARIVO et al., 2001).*** Il y a un manque de données expérimentales examinant la réponse du système immunitaire fœtal bovin contre *N. caninum* en fin de gestation. La plupart des études expérimentales se sont concentrées sur, soit les réponses immunitaires maternelles ***(ROSBOTTOM et al., 2007)*** soit l'immunopathologie au niveau du placenta ***(GIBNEY et al., 2008).*** Les données disponibles montrent qu'au troisième trimestre de gestation, les fœtus bovins sont capables de produire de fortes réponses humorales, avec des titres d'anticorps *Neospora* ≥1 : 20 000 (testés par IFAT) et une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre *N. caninum*, y compris une prolifération lymphocytaire et la production d'IFN-γ dans le sang périphérique, ganglion lymphatique mésentérique, pré-scapulaire et dans la rate ***(ANDRIANARIVO et al., 2001).*** Ces expériences montrent que plus l'âge de gestation augmente plus le risque de mort fœtale associée à une infection par *N. caninum* diminue ***(ANDRIANARIVO et al., 2001).*** Cependant plus la gestation avance, la probabilité que le parasite soit transmis verticalement au fœtus augmente ***(BENAVIDES et al., 2012).***

II.4. Symptômes

L'infection par *N. caninum* est asymptomatique chez les bovins adultes. En période de gestation, la néosporose se manifeste parfois par des avortements apyrétiques, sans rétention placentaire ni complication infectieuse avec un retour en chaleur rapide ***(BJÖRKMAN et al., 1996).*** La vache revient généralement rapidement en chaleurs et sa fertilité pour le cycle suivant n'est pas compromise : le taux de réussite à l'insémination suivante est en principe bon ***(JOURNEL et PITEL, 2001).*** L'avortement survient à partir du troisième mois de gestation et jusqu'au terme ***(DE MEERSCHMAN et LOSSON, 1998)*** avec un maximum d'avortement entre cinq et six mois de gestation. Le fœtus peut mourir *in utero* : il est alors parfois résorbé, momifié ou autolysé. Le veau peut aussi être mort-né ou naître vivant. La mort fœtale peut sans doute survenir pendant toute la durée de la gestation, mais elle peut ne

pas être diagnostiquée en cas de mortalité embryonnaire précoce ou de résorption fœtale, avec retour en chaleur de l'animal ***(DUBEY, 1999).*** Plusieurs études indiquent qu'une vache infectée peut avorter plusieurs fois. Cependant beaucoup d'entre elles sont réformées après le premier avortement et il est donc difficile d'évaluer la fréquence de la récurrence. Toutefois, il semble que moins de 5% (4/112) des vaches séropositives vis-à-vis de *N. caninum* et ayant avorté, avorteraient plus d'une fois ***(ANDERSON et al., 1995).*** Entre 80 et 100% des veaux nés de mères infectées sont eux-mêmes infectés et présentent une sérologie positive avant la prise colostrale ***(JOURNEL et PITEL, 2001).*** Les veaux nés infectés sont, soit normaux cliniquement, mais infectés chroniquement, soit atteints de troubles nerveux, ce qui est plus rare. Les signes cliniques apparaissent, en général, entre 3 et 5 jours après la naissance, mais peuvent apparaître jusqu'à l'âge de deux mois ***(DUBEY et LINDSAY, 1993).*** Les symptômes, puis la mort surviennent plus particulièrement au cours du premier mois ***(DUBEY, 1999).*** Les troubles nerveux se caractérisent par une incapacité à se lever, un retard de croissance fréquent. L'animal peut également présenter de l'ataxie, une raideur des membres, une paralysie, un fléchissement ou une hyper extension des pattes arrière et/ou avant, une perte de proprioception, une diminution du réflexe rotulien, de l'exophtalmie, une déviation du globe oculaire (aspect asymétrique des yeux) et des déformations diverses des membres antérieurs et/ou postérieurs ***(PARISH et al., 1987 ; DUBEY, 2000).*** La néosporose peut parfois être à l'origine de problèmes d'hydrocéphalie ou de malformations de la colonne vertébrale ***(DUBEY, 2003).*** Lorsque les symptômes nerveux sont sévères, l'animal peut présenter de l'hyperthermie. Certains veaux présentent également un déficit pondéral à la naissance, associé à un faible développement musculaire ***(BRUGERE-PICOUX et al., 1998 ; DUBEY, 1999a).*** Le nombre de veaux mort-nés à terme est plus élevé dans les élevages infectés ***(JOURNEL et PITEL, 2001).*** Les fœtus infectés sont pour la plupart nés cliniquement normaux mais infectés de manière persistante, certains peuvent mourir, être réabsorbés, momifiés, autolysés ou mort-nés. Les fœtus avortés présentent généralement des lésions comme une nécrose multifocale entourée de cellules inflammatoires affectant des organes tels que le cerveau, la moelle épinière, le cœur, les poumons et le placenta ***(BARR et al., 1991).*** Environ 80 à 90% des veaux infectés pourraient être porteurs de *N. caninum*. Chez les chiens, *N. caninum* peut provoquer une maladie grave à tous les âges, mais décrit principalement chez les chiots (***NISHIMURA et al., 2015***). La pathologie chez le chien est caractérisé généralement par une paralysie des membres pelviens et une hyperextension rigide ***(DUBEY et SCHARES, 2011 ; REICHEL et al., 2007)***. Les chiens peuvent présenter une encéphalomyélite et une myosite qui se traduisent par une paralysie et une mort prématurée

chez les chiots ***(BJERKAS et al., 1984)***. Cependant, les signes neurologiques observés chez les chiens adultes sont variables selon le site de multiplication du parasite dans le système nerveux central ***(DUBEY, 2003).***

II.5. Lésions

N. caninum est un parasite intracellulaire qui tue les cellules hôtes du fait de la multiplication active des tachyzoïtes par endodyogénie. Ceci provoque des lésions facilement visibles en quelques jours. Ce sont des lésions inflammatoires non suppuratives menant à l'apparition de foyers de nécrose ***(DUBEY et LINDSAY 1993 ; BRUGERE-PICOUX et al., 1998).*** Les kystes à bradyzoïtes peuvent également entraîner des lésions, mais il semblerait que ce soit plus rare. L'inflammation n'est ainsi pas systématique autour des kystes. Il faut d'ailleurs noter que les kystes intacts semblent ne pas entraîner de réaction de la part de l'hôte contrairement aux kystes rompus, autour desquels on observe un granulome ***(BRUGERE-PICOUX et al., 1998).*** Lors d'avortement, les lésions inflammatoires touchent d'abord les cotylédons, lieu de tous les échanges, puis gagnent l'ensemble de l'allantochorion. Ceci a été mis en évidence expérimentalement, puis naturellement par ***OTTER et al. (1995).*** En même temps, le parasite envahit le fœtus par voie sanguine et gagne préférentiellement le système nerveux central, mais parfois aussi le cœur, les muscles squelettiques, les poumons et le foie ***(BUXTON et al., 2002)***. Les fœtus expulsés précocement sont dans la plupart des cas momifiés ou autolysés. Les lésions macroscopiques sont peu nombreuses (plages blanches dans les muscles et le cœur, foyers décolorés ou surcolorés dans l'encéphale, dilatation des cavités cardiaques) ***(ANDERSON et al., 1994).*** Les lésions placentaires et fœtales démontrent que *N. caninum* est un pathogène capable d'induire par sa seule multiplication des avortements, par l'inflammation du placenta maternel, la nécrose et l'inflammation du placenta fœtal et maternel, ou les dommages fœtaux, voire la combinaison des trois. Cependant, en général, le nombre de parasites retrouvés dans les tissus fœtaux est faible, même chez les sujets bien préservés. Ceci pourrait être dû à la pathogénie même des avortements : la réponse immunitaire maternelle ou la lutéolyse induite par les prostaglandines causerait l'expulsion du fœtus avant que le parasite ait le temps de se multiplier en grand nombre ***(SARRAZIN, 2009).*** Sur le plan microscopique, les lésions cérébrales sont caractérisées par une infiltration leucocytaire multifocale ou diffuse (encéphalomyélite non-suppurée), parfois associée à des foyers de nécrose ou encore à des foyers de gliose. Ces derniers sont souvent adjacents des capillaires dont l'endothélium est hypertrophié et entouré d'un manchon de cellules mononuclées. L'image la plus caractéristique correspond à des foyers nécrotiques, le plus souvent situés dans la substance blanche, dans le tronc cérébral,

entourés de cellules mononuclées. Une infiltration leucocytaire mononuclée des méninges, et des kystes parasitaires sont visibles dans certains cas. Enfin, une calcification précoce des foyers nécrotiques a été décrite ***(DUBEY et LINDSAY, 1996).*** Il faut noter qu'en absence de réaction immunitaire et de certains facteurs physiologiques (chez l'adulte et le fœtus âgé), les tachyzoïtes continueraient à se multiplier, provoquant la mort de nombreuses cellules et même la mort de l'hôte. Un équilibre s'établit donc entre la multiplication rapide et pathogène des tachyzoïtes et la capacité de l'hôte à se défendre contre l'infection. Cet équilibre permet ainsi, la survie de l'hôte, mais aussi celle du protozoaire parasite ***(BUXTON et al., 2002).*** La connaissance des différents symptômes et lésions provoqués par la néosporose a un intérêt particulièrement important pour le diagnostic de la maladie bien que les symptômes ne soient pas univoques, particulièrement chez les bovins, et que d'autres protozoaires induisent des lésions comparables.

II.6. Impact économique de la néosporose bovine

La néosporose entraîne des pertes économiques pour la production de bovins laitiers et de boucherie ***(LARSON et al., 2004).*** ***TREES et al.*** ont évalué les différentes pertes occasionnées par le parasite qui sont principalment les avortements, diminution voire arrêt de la production laitière, baisse de la valeur marchande des animaux, handicap à la vente, augmentation du taux de réforme, mortinatalité et mortalité embryonnaire ***(TREES et al. 1999)***. La mortalité embryonnaire fortement suspectée mais non prouvée. ***WALDNER et al***. ont trouvé une association significative entre baisse du taux de fécondation et séropositivité à Neospora ***(HOAR et al. 1996 ; WALDNER et al. 2001).*** De plus, la néosporose entraîne un allongement de l'intervalle entre les vêlages ***(HALL et al., 2005),*** ainsi qu'une diminution de la valeur reproductrice du cheptel ***(HADDAD et al., 2005).*** A propos de la production laitière***,*** ***THURMOND et HIETALA*** ont prouvé que les vaches atteintes de néosporose subissent une baisse de leur production laitière et cela sans relation avec un avortement associé ***(THURMOND et HIETALA, 1997).*** Cet effet a été retrouvé chez des primipares uniquement. Elles ont une production diminuée de 1,25 kg de lait par jour environ, soit sur 300 jours de lactation en moyenne, une perte nette de 375 kg de lait par an. A propos de la réforme, une étude californienne a estimé, en suivant des animaux infectés par Neospora, que les vaches séropositives avaient 1,6 fois plus de chances d'être réformées que les vaches saines. Ce risque est surtout dû aux problèmes de production laitière. Mais dès que la vache a des problèmes de reproduction ou d'avortement, elle a 2 fois plus de chances d'être réformée qu'une vache saine ***(THURMOND et HIETALA 1996)***. ***DUBEY*** a estimé le coût annuel de la néosporose pour l'industrie laitière à 30 millions de dollars. Il inclut dans cette estimation les pertes dues aux

avortements, au remplacement des animaux, à la diminution de la production laitière, de l'efficacité reproductrice, et des frais de diagnostic ***(DUBEY, 1999)***. Un modèle économique a aussi été élaboré par des néozélandais ***(PFEIFFER et al. 1997)***. Ainsi pour la Nouvelle-Zélande uniquement, les pertes dues à *Neospora caninum* sont estimées à 16,5 millions de dollars néozélandais (3000 dollars néozélandais par troupeau en moyenne). Les pertes intégrées dans ce modèle sont les pertes dues au veau avorté, à la baisse de production laitière, au coût de la réforme et du remplacement. À l'échelle mondiale, les pertes causées par la néosporose sont d'environ un million de dollars par an *(**REICHEL et al., 2013**).*

II.7. Découverte de *Neospora caninum*

Neospora caninum est un parasite intracellulaire identifié pour la première fois comme un organisme distingue en Norvège (1984) chez des chiens atteints d'encéphalopathie et de myosite, ce parasite ressemblait à *T. gondii* même si aucun anticorps anti-toxoplasma n'a été observé chez ces chiens ***(BJERKAS et al., 1984 ; DUBEY et al., 1988a)***. Après une étude rétrospective effectuée en 1988 sur la toxoplasmose canine aux Etats unies, un parasite a été isolé sur culture cellulaire, identifié et dénommé *Neospora caninum* ***(DUBEY et al., 1988b).*** L'implication de *Neospora caninum* dans des avortements chez des bovins date de 1989 ***(SHIVAPRASAD et al. 1989 ; THILSTED & DUBEY, 1989)***. Après il a été considéré dans la plupart des pays du monde comme un agent abortif majeur chez l'espèce bovine ***(DUBEY et al 2007).***

II.8. Classification de *Neospora caninum*

Neospora caninum est un parasite protozoaire de phylum des Apicomplexa, classe des Sporozoea, sous classe des Coccidia. Ordre des Eucoccidia, sous ordre des Eimeriidae. Il est classé dans la famille des Sarcocystidae, Le genre Neospora est classé dans la sous-famille des Toxoplasmatina, avec les genres Toxoplasma, Hammondia, Cystoisospora, Besnoïtia, Sarcocystis, Frenkelia ***(Figure 4).*** *Neospora caninum* était le seul représentant de son genre. En 1998 ***MARSH*** et ses ***COLLABORATEURS*** *ont* isolé une autre espèce de genre Neospora chez le cheval baptisé *Neospora hughesi.* Des différences génomiques morphologiques et antigéniques ont été observées entre *N. hughesi* et *N. caninum* ***(MARSH et al., 1998).***

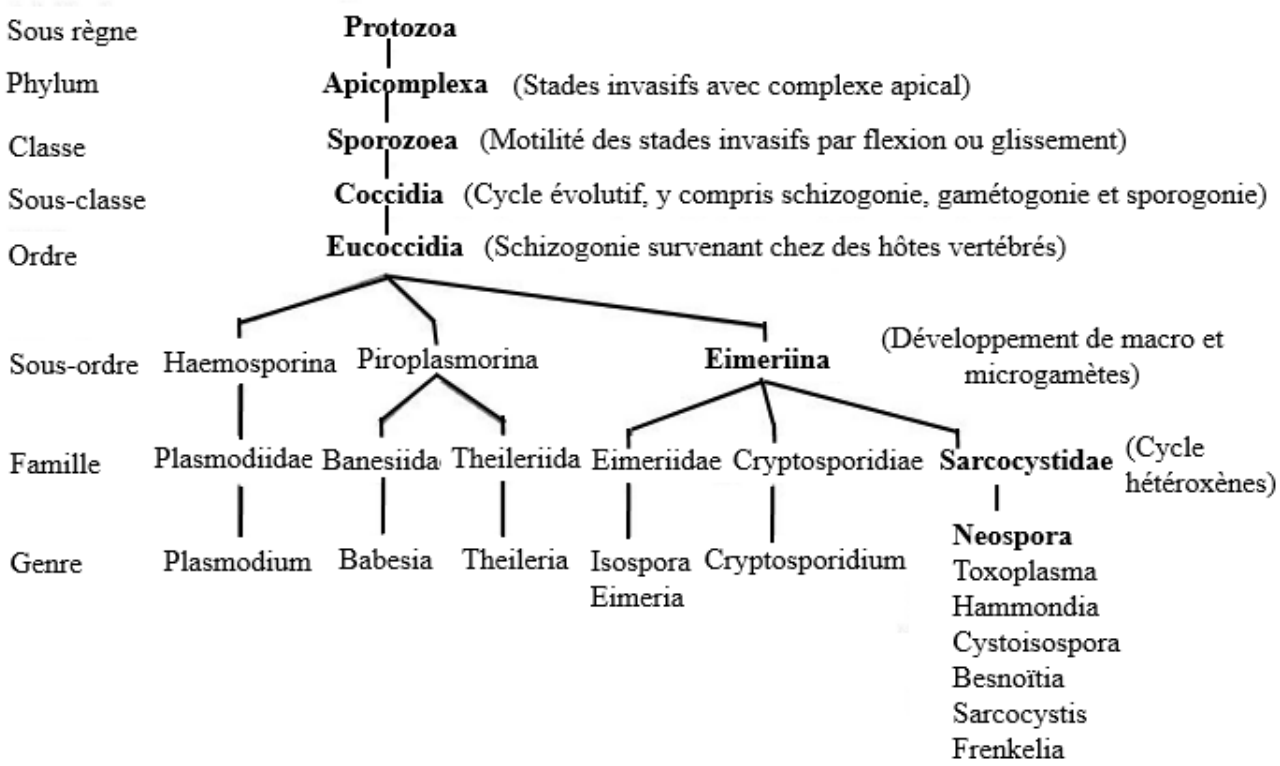


Figure 4 : Classification taxonomique de *Neospora c*es principales caractéristiques de chaque niveau organisationnel ***(MARUGAN-HERNANDEZ, 2017).***

II.9. Cycle de vie de *Neospora caninum*

II.9.1. Hôtes intermédiaire et définitifs

Les chiens (*Canis familiaris*) sont généralement l'hôte définitif de *N. caninum* ***(MCALLISTER et al., 1998)*** bien que d'autres canidés tels que les coyotes (*Canis latrans*) ***(GONDIM et al., 2004),*** le dingo d'Australie (*Canis lupus dingo)* ***(ALMERIA, 2013)*** et les loups gris (*Canis lupus*) **(*DUBEY et al., 2011*)** excrètent des oocystes après s'être nourris de kystes tissulaires infectés. Même si les chiens infectés par *N. caninum* ne soient pas toujours séropositifs ***(LINDSAY et al., 1999a ; MCALLISTER et al., 1998),*** tous les chiens doivent être considérés comme une source importante de transmission de *N. caninum*, qu'ils soient séroconvertis ou non ***(REICHEL et al., 2014).*** Plusieurs espèces animales peuvent être infectées par *N. caninum* : les parasites isolés de chiens ont été classés comme Nc-1 ***(DUBEY et al., 1988b),*** Nc-Bahia (***SAWADA et al., 2000***) et Nc Liverpool (***BARBER et al., 1993***). Nc BPA1, BPA2 (***CONRAD et al., 1993***), Nc KBA1, KBA2 (***KIM et al., 2000***), Nc-Spain 1H ***(ROJO-MONTEJO et al., 2009)***, Nc-Spain 2H, 3H, 4H, et 5H ainsi que Nc-Espagne 6, 7, 8, 9 et 10 ***(REGIDOR-CERRILLO et al., 2008)*** ont été isolés à partir de bovins ; Nc-Sheep de mouton ***(KOYAMA et al., 2001)*** et NcBrBuf 1, 2, 3, 4 et 5 de buffle d'eau ***(RODRIGUES et al., 2004)***. En outre, des anticorps contre *N. caninum* ont été détectés chez le cerf de Virginie

(*Odocoileus virginianus*) ***(LINDSAY et al., 2002)***, les corbeaux (*Corvus corax*) ***(MOLINA-LOPEZ et al., 2012)***, les lièvres (*Lepus europaeus*), zèbre (*Equus burchelli*), cerf de Thorold (*Cervus albirostris*), cerf sika (*Cerus Nippon pseudodaxis*), daim (*Dama dama*), orignal (*Alces alces*), mouflon (*Ovis ammon*), bison d'Europe (*Bison Bonasus*), mer loutre (*Enhydra lutris*) et dauphin (*Tursiops truncatus*) ***(DUBEY et al., 2007).*** Ces observations suggèrent que les animaux sauvages jouent également un rôle important dans l'épidémiologie de la néosporose.

II.9.2. Stades infectieux de *N. caninum*

Il existe trois stades infectieux de *N. caninum* appelés tachyzoïtes, bradyzoïtes et sporozoïtes. Les tachyzoïtes et les bradyzoïtes se trouvent dans les tissus des hôtes intermédiaires et définitifs, tandis que les sporozoïtes se trouvent dans les sporocystes à l'intérieur des oocystes, qui se forment dans l'intestin de l'hôte définitif et sont excrétés via leurs selles ***(DUBEY et al., 2006).***

II.9.2.1. Stade sporozoïte

Le stade sporozoïte de *N. caninum* se trouve dans l'oocyste. Chaque oocyste contient deux sporocystes et chaque sporocyste contient quatre sporozoïtes ***(LINDSAY et al., 1999b).*** La taille des oocystes est d'environ 10 x 12 µm avec une paroi lisse incolore de 0,6 à 0,8 µm d'épaisseur. Les oocystes sont sphériques à sous-sphériques et excrétés avec les fèces de l'hôte définitif sous forme non sporulée. Les sporocystes sont ellipsoïdaux avec une taille de 8 x 6 µm et leur épaisseur de paroi est de 0,5 à 0,6 µm. Les sporozoïtes sont caractérisés par la position du noyau, qui est situé au centre ou légèrement en arrière ***(LINDSAY et al., 1999b).*** Bien que la biologie de l'oocyste de *N. caninum* soit peu connue, il s'agit d'un facteur clé de l'épidémiologie de la néosporose chez les bovins ***(DUBEY et al., 2007).*** Le grand nombre d'oocystes contaminés dans l'environnement entraîne un risque élevé d'infection ***(GOODSWEN et al., 2013)***. La période prépatente avant l'excrétion des oocystes par l'hôte définitif varie de 5 à 10 jours après l'infection à *N. caninum* ***(AL-QASSAB et al., 2010)*** et ils peuvent être excrétés en continu pendant 10 jours ***(MCALLISTER et al., 1998 ; MCCANN et al., 2007).*** L'âge de l'hôte, le type de tissus d'alimentation et le statut immunitaire de l'hôte affectent le taux d'excrétion des oocystes ***(DUBEY et al., 2007).*** Par exemple, le nombre d'oocystes excrétés était plus élevé chez les chiens qui ingéraient des tissus de veau infectés que chez ceux qui avaient ingéré des kystes tissulaires de souris. Il a également été démontré que les chiots infectés excrétaient des oocystes à un taux plus élevé que les chiens adultes ***(GONDIM et al., 2002***).

II.9.2.2 Stade tachyzoïte

Le tachyzoïte est une forme à réplication rapide de *N. caninum* associée à une infection aiguë. La taille du tachyzoïte de *N. caninum* est de 3 à 7 x 1 à 5 µm ***(DUBEY et al., 2002)***, ce qui est légèrement plus grand que *T. gondii* et dépend du stade de réplication ***(DUBEY et LINDSAY, 1996***). Le tachyzoïte de *N. caninum* a une forme de croissant, pointu à l'extrémité antérieure et arrondi à l'extrémité postérieure ***(Figure 5).*** Il contient deux anneaux apicaux, 22 microtubules subpelliculaires, un conoïde, un cytosquelette, un micropore, un microtubule subpelliculaires, des organites sécrétoires (comme des rhoptries, des micronèmes et des granules denses), des mitochondries, un apicoplaste, un réticulum endoplasmique, un noyau, un complexe de Golgi et un ribosome *(**SPEER et DUBEY, 1989 ; LINDSAY et al., 1993**).* La membrane externe est recouverte d'une pellicule qui se compose de trois couches de membrane plasmique.

Tableau 1 : Caractéristiques structurelles et morphologiques des stades de *N. caninum* **(DUBEY et al. 1989, 2002, 2004 ; BARR et al. 1991 ; SPEER et al. 1999).**

Stade	Tachyzoïdes	Bradyzoïdes	Ookystes
Forme	ovoïde	Ronds à ovales	Sphériques
Taille	3 à 7 µm sur 1 à 5µm	Kystes : jusqu'à107 µm Bradyzoites : 6 à 8 µm sur 1 à 1.8 µm	10 à 11 µm
Localisation	Dans de nombreux types cellulaires, à l'intérieur d'une vacuole parasitochore	Kystes : tissu nerveux	Selles de l'hôte définitif (chien)
Structure	2 anneaux apicaux 1 conoide 1anneau polaire mitochondries Jusqu'à 150 micronèmes 1appareil de Golgi REL et REG 1 noyau et nucléole	Kyste à paroi lisse d'une épaisseur pouvant aller jusqu'à 4 µm (1 à 2 en général), contenant de 50à 200 bradyzoites. Memes oganites que pour les tachyzoites	Avant sporulation :1 sporonte central Après sporulation : , 2 sporocystes contenant chacun sporozoïtes

Les tachyzoïtes se divisent en deux tachyzoïtes par endodyogénie et ils peuvent être trouvés dans les cellules neurales, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales vasculaires, les hépatocytes, les myocytes et les cellules épithéliales tubulaires rénales ***(BJERKAS et PRESTHUS, 1989 ; DUBEY et al., 1988a ; SPEER et DUBEY, 1989).*** Les tachyzoïtes envahissent les cellules hôtes par invasion active, se localisent dans une vacuole parasitophore et deviennent intracellulaires dans les 5 minutes après leur fixation avec les

cellules hôtes ***(HEMPHILL et al., 1996)***. Ils peuvent être situés dans plus d'un vacuole parasitophore par cellule hôte.

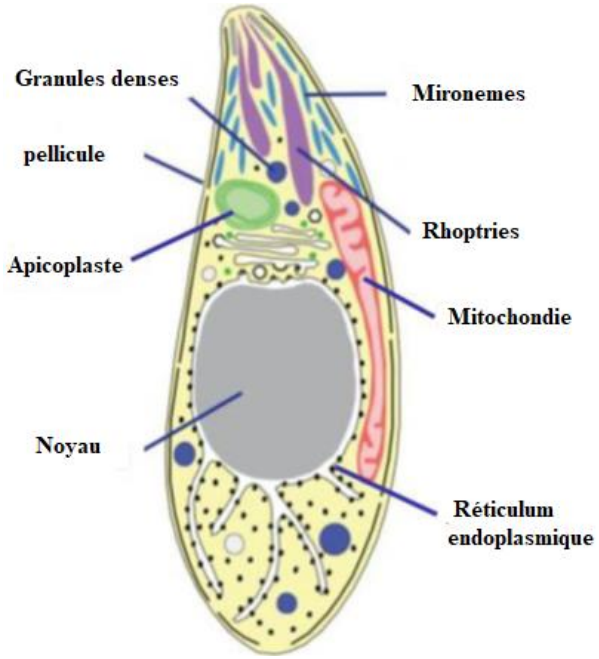


Figure 5 : Schéma du tachyzoïte de *N. caninum* ***(REID et al., 2012)***

II.9.2.3. Stade bradyzoïte

Le bradyzoïte est une forme à réplication lente de *N. caninum* qui représente le stade chronique de la maladie. Les bradyzoïtes forment des kystes avec des parois jusqu'à 4 µm d'épaisseur ; la taille des kystes varie en fonction du nombre de bradyzoïtes qu'ils contiennent ***(DUBEY et al., 2006).*** La forme des kystes tissulaires est souvent ronde à ovale et peut atteindre 107 µm de long ***(Figure 6).*** On les trouve principalement dans les tissus nerveux tels que la moelle épinière, cerveau, les nerfs et la rétine ***(DUBEY et al., 1988a ; DUBEY et al., 1990)*** et on les trouve dans les muscles squelettiques ***(DUBEY et al., 1989)***. Le bradyzoite est mince et a une taille de 6 à 8 x 1 à 1,8 µm. Ils contiennent les mêmes organites que ceux trouvés dans les tachyzoïtes sauf qu'il y a moins de rhoptries et plus de granules d'amylopectine que de tachyzoïtes ***(DUBEY et LINDSAY, 1996)***.

II.9.2.4. Stade de conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes de *N. caninum*

Les tachyzoïtes de *Neospora caninum* peuvent se convertir en bradyzoïtes en réponse à l'immunité de l'hôte. Les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes après avoir été déclenchés la réponse immunitaire de l'hôte, conduisant à la formation de kystes dans les tissus de l'hôte. La réactivation peut survenir chez les bovins gravides en raison de la suppression de l'immunité de l'hôte et entraîner une transmission transplacentaire ***(GHALMI, 2011).*** La transmission transplacentaire est une voie importante pour la persistante de l'infection de génération en génération. La connaissance de l'expression des protéines impliquées dans la

conversion du stade de *N. caninum* fournira une meilleure compréhension de la pathogénie de la néosporose. La conversion tachyzoïte-bradyzoïte *in vitro* peut être induite chez *T. gondii* par utilisation des inhibiteurs de la fonction mitochondriale et des inducteurs de stress oxydatif ***(BOHNE et al., 1994 ; SOETE et al., 1994).*** Il a été démontré que l'oxyde nitrique (NO) induit cette conversion de stade car c'est un inhibiteur de la fonction mitochondriale et un facteur de stress indirect des parasites ***(LYONS et al., 2002)***. La conversion du stade bradyzoïtes-tachyzoïtes pourrait également être induite en utilisant un milieu alcalin ***(SOETE et al., 1993)***.

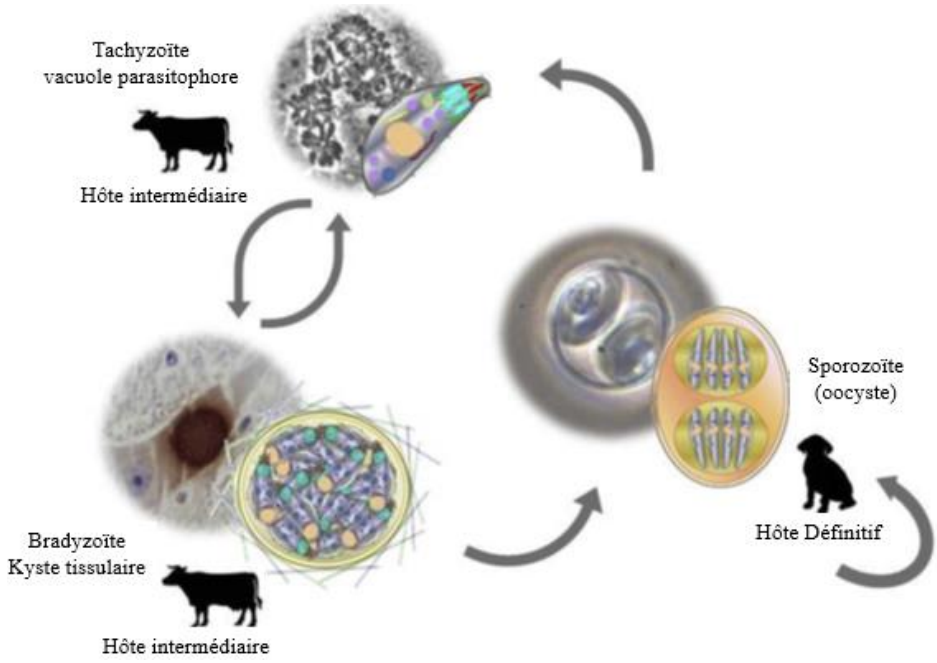


Figure 6 : Stades de *Neospora caninum* ***(MARUGAN-HERNANDEZ, 2017).***

Pour *N. caninum*, ***VONLAUFEN et al. (2002)*** ont développé avec succès le test de conversion de stade des tachyzoïtes en bradyzoïtes par utilisation de 70 µM du nitroprussiate de sodium (SNP) et les parasites peuvent survivre jusqu'à 8 jours. Les kératinocytes épidermiques murins ont été utilisés comme modèle hôte qui a été infecté par des tachyzoïtes de la souche de *N. caninum* Liverpool. Leur résultat a révélé une réduction significative de la multiplication des parasites. Le test d'immunofluorescence a été utilisé pour détecter les anticorps NcBAG1 qui pouvaient être détectés d'abord au 4ème jour (expression de NcBAG1 à 35%), puis au 8ème jour (expression de NcBAG1 à 60%) dans la vacuole parasitophore (VP) et ces VP exprimant NcBAG1 présentaient une expression fortement réduite des antigènes marqueurs des tachyzoïtes NcAG1. L'autre conversion de *N. caninum* (Tachyzoïtes en bradyzoïtes) a également été réalisé par ***VONLAUFEN et al. (2004)*** utilisant pour le développement un autre type de cellule hôte (cellules Vero). Ils ont constaté que la concentration optimale de

nitroprussiate de sodium (SNP) était de 17 µM. Cette concentration n'a pas détruit visiblement l'intégrité structurale de la monocouche de cellules Vero.

II.9.3 Cycle évolutif

N. caninum est un parasite hétéroxène nécessitant plus d'un hôte pour compléter son cycle de vie ; la réplication sexuelle a lieu chez les hôtes canidés définitifs et la réplication asexuée a lieu chez les hôtes bovins intermédiaires ***(DONAHOE et al., 2015 ; DUBEY et al., 2006)***. Le cycle de vie de *N. caninum* comprend trois stades infectieux distincts appelés sporozoïtes (forme d'excrétion), tachyzoïtes (forme de multiplication rapide) et bradyzoïtes (forme résistance) ***(DUBEY, 1999b) (Figure 7).*** Les oocystes non sporulés sont excrétés par l'hôte définitif dans l'environnement dans les 5 à 17 jours suivant l'ingestion de kystes tissulaires ***(LINDSAY et al., 1999a)***. Les oocystes sporulés sont actifs après 3 jours dans l'environnement. Chaque oocyste sporulé contient deux sporocystes et chaque sporocyste renferme quatre sporozoïtes ***(DUBEY et al., 2002).*** L'oocyste est résistant à la dégradation environnementale, avec une paroi qui est tolérante à la congélation et au séchage, permettant aux sporozoïtes infectieux de survivre dans l'environnement externe pendant plusieurs semaines ***(UNJIT, 2018)***. L'hôte intermédiaire ainsi que l'hôte définitif peuvent être infectés par *N. caninum* en ingérant des oocystes contenant du sporozoïte. Les sporozoïtes sont libérés de l'oocyste ingéré dans l'intestin de l'hôte, ceux-ci envahissent ensuite la paroi intestinale et se différencient en tachyzoïtes. L'invasion cellulaire par les tachyzoïtes entraîne la création d'une membrane vacuolaire parasitophore qui est suivie d'une réplication asexuée rapide par endodyogénie. Les tachyzoïtes peuvent être transmis au fœtus en développement via le placenta. En réponse aux réponses immunitaires de l'hôte, les tachyzoïtes à division rapide peuvent se convertir en bradyzoïtes à réplication lente qui peuvent survivre pendant toute la vie de l'hôte intermédiaire ***(DUBEY et LINDSAY, 1996)***. Les bradyzoïtes résidant dans les kystes tissulaires quiescents peuvent conduire à une infection recrudescente si le système immunitaire de l'hôte est supprimé, par exemple pendant la gestation ou une maladie concomitante ***(HADDAD et al., 2005).*** Lorsque les mêmes kystes tissulaires sont ingérés par des chiens, souvent via de la viande contaminée, les bradyzoïtes sont libérés du kyste et infectent les cellules épithéliales de l'intestin grêle, conduisant finalement à la différenciation des gamétocytes. La fusion des gamétocytes pour produire des oocystes non sporulés dans la lumière de l'intestin canin complète le cycle de vie. Le chien, hôte définitif, ingère des kystes tissulaires et transmet des oocystes non sporulés dans l'environnement dans ses fèces. Les hôtes intermédiaires, comme les bovins, ingèrent des oocystes sporulés, puis les sporozoïtes se libèrent et forment des tachyzoïtes dans la muqueuse cellulaire de l'intestin. L'hôte définitif

peut être infecté en ingérant un kyste tissulaire ou les tachyzoïtes se transmettront à travers le placenta et infecteront les fœtus. L'hôte définitif est infecté en ingérant de la viande infectée contenant des kystes tissulaires.

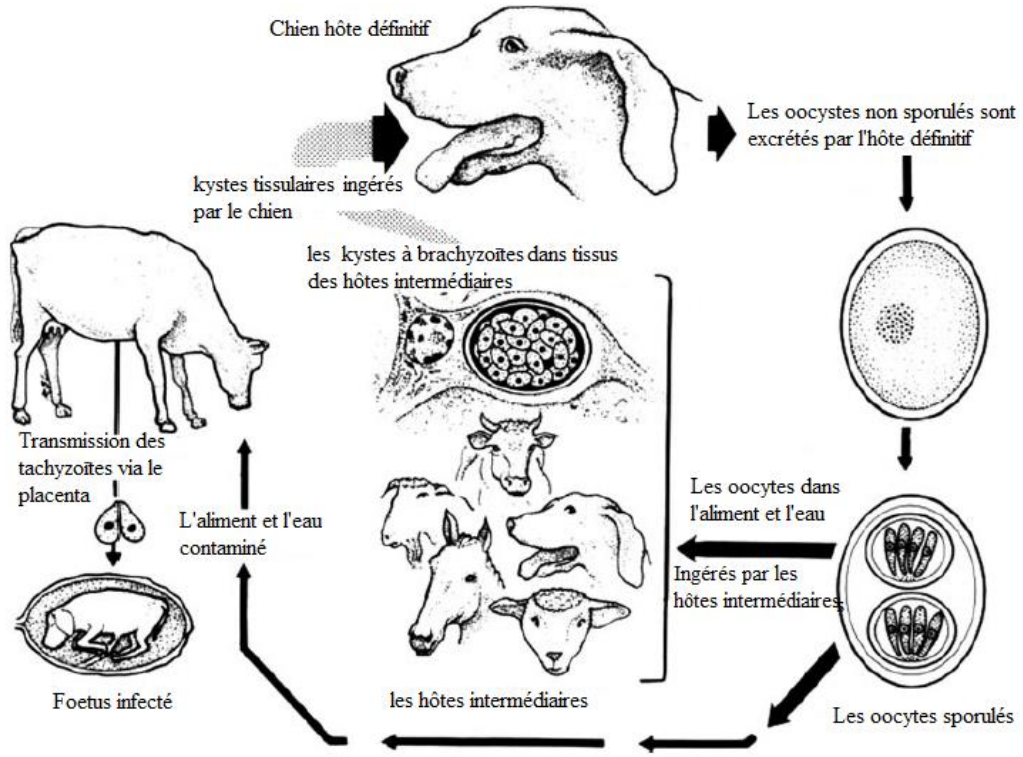


Figure 7: Cycle de vie de *Neospora caninum* ***(DUBEY et al.,2007)***.

II. 10 Transmission de *N. caninum*

II.10.1. Transmission verticale

La transmission verticale (transplacentaire ou congénitale) d'une mère gestante infectée à son fœtus est considérée comme la principale voie de transmission de *N. caninum* dans les troupeaux de bovins ***(UGGLA et al., 2000 ; INNES et al., 2001 ; OMATA et al., 2004, GONZALEZ-WARLETA et al. 2018 ; DE AQUINO DINIZ LV et al., 2019)***. Cette voie de transmission joue un rôle important dans le maintien de l'infection au sein du troupeau ***(ROJO-MONTEJO et al., 2009a).*** Une fois infectés, les bovins et les chiens peuvent rester infectés toute leur vie ***(BARBER et TREES, 1998).*** Transmission transplacentaire peuvent être classés en fonction de l'origine de l'infection endogène (EnTT) ou exogène (ExTT). L'infection EnTT est causée par la réactivation des kystes tissulaires chez une vache infectée auparavant (de manière chronique) et est associé avec l'échec de la reproduction et maintien de l'infection au sein du troupeau (***GONZALEZ-WARLETA et al. 2018 ; MARUGAN-HERNANDEZ, 2017)***. En revanche, l'infection ExTT se produit après une infection primaire horizontale (c.-à-d. que les oocystes sont ingérés par une vache gestante). Cette voie de transmission est

particulièrement efficace si l'on se base sur la présence d'anticorps spécifiques précolostraux chez les veaux nés de mères séropositives. Ainsi, les taux de transmission de la mère au fœtus varient de 81 à 95% en fonction des études ***(PARE et al., 1996 ; SCHARES et al., 1998).*** Dans la plupart des cas, les veaux issus de mères infectées naissent cliniquement sains, ce qui est corrélé à un fort titre d'anticorps chez la mère dans le dernier tiers de gestation ***(PARE et al., 1996).*** Il est admis que les animaux restent infectés à vie ***(HEMPHILL et GOTTSTEIN, 2000).*** La période de gestation où a lieu la parasitémie, son intensité et sa durée, l'efficacité de la réponse immunitaire maternelle et la capacité du fœtus à développer une réponse immunitaire semblent influencer l'infection verticale ***(HEMPHILL et GOTTSTEIN, 2000).*** La transmission verticale, a été décrite dans les conditions naturelles chez la chienne, la vache, la chèvre, la jument, la brebis, et a été induite expérimentalement chez les bovins, la brebis , la chèvre, la souris, le chien, le chat, le singe et le porc ***(DUBEY, 2007).*** Chez la chienne, l'efficacité de la transmission verticale semble plus variable ***(BARBER et TREES, 1998). CAVALCANTE et al. (2012)*** ont confirmé la transmission transplacentaire de *N. caninum* chez le chien. Six chiennes en deux groupes ont été inoculées avec une dose très élevée (108 tachyzoïtes). Dans le groupe I, trois chiennes ont été inoculées au cours de la troisième semaine de gestation, et dans le groupe II, trois chiennes ont été inoculées à la sixième semaine de gestation. Les chiennes étaient autorisées à mettre bas naturellement. Les mères et leurs petits ont été testés par immunohistochimie (IHC), sérologie et PCR. Dans le groupe I, six des dix petits sont morts dans les 48 heures suivant la naissance. Dans le groupe II, sept des 13 petits sont morts entre cinq et dix jours après la naissance. L'ADN de *N. caninum* a été détecté par PCR imbriquée chez deux chiots (cœurs des deux et foie d'un) du groupe I, et un petit dans le système nerveux central (SNC) et ganglion lymphatique du groupe II. Les mères et les petits qui ont survécu étaient cliniquement normaux. Une autre source possible d'infection peut être de bovin à bovin est la transmission par le lait, les liquides de vêlage ou les membranes fœtales ***(UGGLA et al., 1998).*** Ce type de transmission est documenté chez les veaux par administration orale du colostrum ou du lait de remplacement infecté expérimentalement même une semaine seulement après le vêlage, cependant, les bovins n'ont pas été infectés lorsqu'ils ont reçu du lait ou du colostrum de vaches naturellement infectées par *N. caninum* ***(DAVISON et al., 2001).*** Les chiens nourris au colostrum inoculés avec des tachyzoïtes de *N. caninum* n'ont pas excrété d'oocystes ***(DIJKSTRA et al., 2001).***

II.10.2. Transmission horizontale

La transmission horizontale de *N. caninum* se fait, chez les bovins, ovins, caprins et rongeurs, soit par l'ingestion d'aliment et/ou d'eau de boissons souillées par les oocystes d'hôtes

définitifs ***(Figure 8)*** , soit par ingestion des tissus infestés (l'ingestion de fœtus ou tissus placentaires infectés par des kystes tissulaires) (***WOUDA et al., 1999 ; TREES et WILLIAMS, 2000 ; TREES et al., 2002 ; GONDIM et al., 2004, DUBEY et al., 2007)***. La confirmation de ce mode de transmission a été établie à partir de la découverte du chien comme hôte définitif dans le cycle de *N. caninum*. La transmission verticale ne pouvait pas, à elle seule, assurer la pérennité de la circulation parasitaire ou provoquer des épidémies d'avortements ***(ANDERSON et al., 2000)***. En effet, dans certains cas, une source ponctuelle semble à l'origine des épisodes abortifs et les différences de séroprévalence entre les différents groupes d'âge dans des troupeaux, suggèrent l'existence d'une source d'infection post-natale ***(LOSSON et BOURDOISEAU, 2000)***

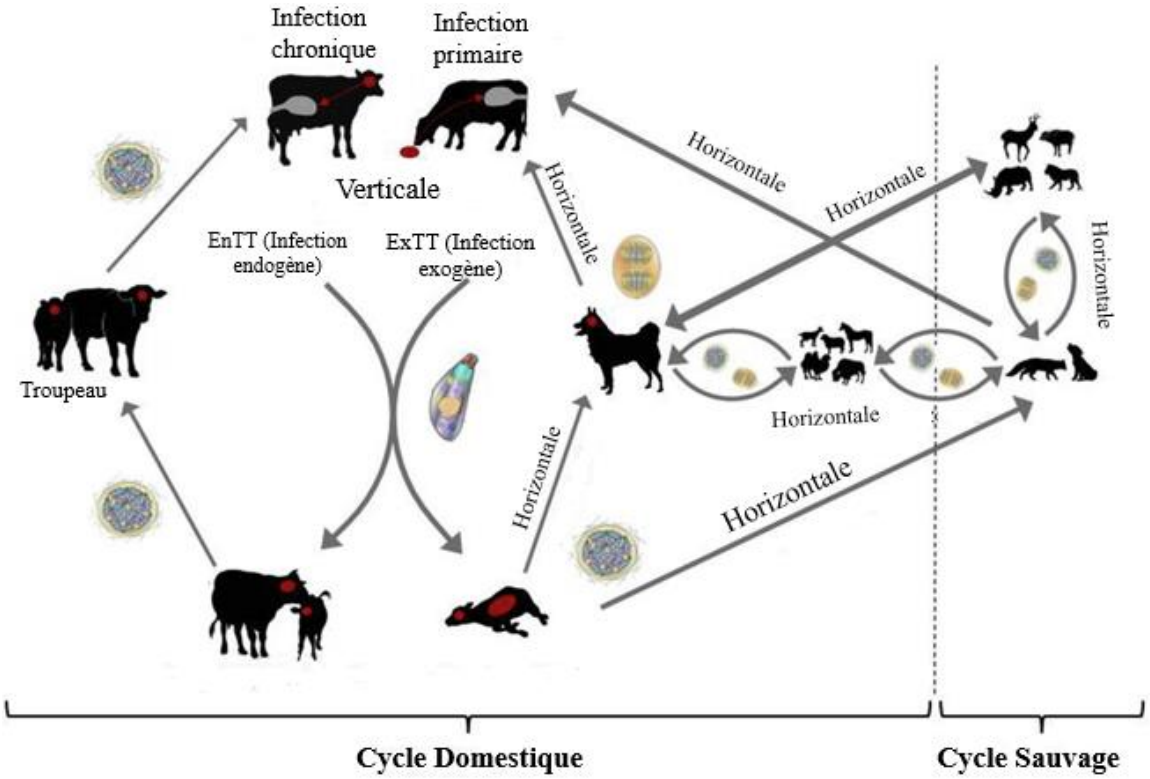


Figure 8 : Transmission de *Neospora caninum* ***(MARUGAN*-HERNANDEZ, *2017)***.

La transmission verticale de la vache au fœtus peut se produire par voie endogène (EnTT, à partir de animaux déjà infectés) ou exogène (ExTT, à partir d'animaux nouvellement infectés). L'infection peut provoquer la mort du fœtus ou naissance de veau infecté cliniquement sain, qui peut à son tour potentiellement infecter l'hôte définitif. Veaux infectés congénitalement et cliniquement sain peuvent contribuer au maintien de l'infection au sein du troupeau et avoir le potentiel de se transmettre horizontalement à d'autres espèces domestiques ou sauvages.

II.11. Répertoire antigénique de *N. caninum*

La plupart des antigènes de *N. caninum* qui ont été identifiés et caractérisés à ce jour, sont soit localisés sur la surface des protozoaires, soit dans les organites sécrétoires ***(VONLAUFEN et al., 2004***). Les informations mises à jour concernant le protéome de *N. caninum* a été récemment obtenu en utilisant la chromatographie liquide à haut débit-masse en tandem spectrométrie (LC-MS / MS), qui a permis l'étude de l'abondance relative des plusieurs protéines antigéniques dans différents isolats ***(HORCAJO et al., 2018).*** La plupart des antigènes identifies chez les protozoaires Apicomplexa sont soit liés à des structures de surface soit localisés dans les organites de sécrétion à savoir les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. Ceux-ci ont d'importantes fonctions durant la pénétration dans la cellule hôte ou dans le développement intracellulaire du parasite ***(HEMPHILL et al., 1999).***

II.11.1. Antigènes de surface

La surface de *N. caninum* est recouverte de glycosylphosphatidylinositol (GPI) - protéines ancrées, dont la plupart sont membres de la superfamille SRS ***(LEKUTIS et al., 2001)***. Plusieurs protéines SRS de *N. caninum* ont été identifiées et caractérisées à ce jour. Ceux-ci incluent NcSAG1 et NcSRS2 qui sont spécifiques du tachyzoïte et NcSAG4 ***(FERNANDEZ-GARCIA et al., 2006),*** NcBSR4 ***(RISCO-CASTILLO et al., 2007)*** et NcSRS9 (***RISCO-CASTILLO et al., 2011)*** qui sont exprimés par le stade bradyzoite. En plus, NcSRS67, un SRS sans orthologue chez *T. gondii*, a été récemment identifié et extrait de tachyzoïte de *N. caninum* (souche Nc-1) ***(POLLO-OLIVEIRA et al., 2013 ; BEZERRA et al., 2017***). *In vitro,* l'immunomarquage et la microscopie confocale au laser des tachyzoïtes de *N. caninum* ont démontré le rôle principal des deux principaux antigènes de surface immunodominants, NcSAG1 et NcSRS2 ***(HOWE et al., 1998),*** dans le cadre du processus d'invasion ***(NISHIKAWA et al., 2000).*** Les anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre ces deux protéines empêchent les tachyzoïtes d'adhérer et d'envahir les cellules cibles ***(NISHIKAWA et al., 2000 ; HALDORSON et al., 2006,).*** NcSAG1 et NcSRS2 sont caractérisés par une immunogénicité élevée, ils ont été largement étudié dans le cadre du développement de vaccins et fréquemment utilisés pour le développement de tests diagnostiques ***(BASZLER et al., 2008, OTSUKI et al., 2013).***

II.11.2. Protéines des micronèmes (MIC)

Les micronèmes sont des organites en forme de cigare qui se regroupent à l'extrémité apicale du parasite ***(CARRUTHERS et TOMLEY 2008)*** et sécrètent les protéines des micronèmes qui ne sont pas seulement essentiels l'adhérence aux cellules hôtes mais sont également cruciales pour le mouvement de glissement ***(DOWSE et SOLDATI, 2004).*** Les protéines des

micronèmes sont caractérisés par des domaines adhésifs qui interagissent avec récepteurs localisés sur les surfaces des cellules hôtes cibles. Les MIC fonctionnent comme des protéines complexes en interagissant avec plusieurs éléments tels que les protéines du col de rhoptries (rhoptries neck proteins : RON). De nombreux MIC ont été découverts chez T. gondii et plusieurs *N. caninum* à ce jour, des homologues et orthologues ont été identifiés et caractérisés. Celles-ci comprennent : NcMIC1 (***KELLER et al., 2002***), NcMIC2, NcMIC2-like, NcMIC3 ***(NAGULESWARAN et al., 2001),*** NcMIC4 ***(KELLER et al., 2004)*** NcMIC6 (LI et al., 2015), NcMIC8 ***(WANG et al., 2017),*** NcMIC10 ***(YIN et al., 2012)***, SPATR, NcPDI et NcSUB1 qui se caractérise par une activité protéolytique et une immunogénicité élevée ***(YBANEZ et al., 2013).***

II.11.3. Protéines des rhoptries (RON et ROP)

Les rhoptries sont des organites situés au pôle antérieur des Apicomplexes ***(KEMP et al., 2013).*** Les protéines rhoptrie comprennent les protéines du cou de rhoptrie(RON), qui sont localisés dans la partie de l'organelle en forme de long cou et sont impliqués dans le formation de la jonction mobile ***(MARUGAN-HERNANDEZ et al., 2011),*** et le ROP famille des kinases : un groupe de protéines impliquées comme déterminants de la virulence à la fois chez *N. caninum* et *T. gondii* ***(REID et al., 2012).*** Une souche de *N. caninum* déficiente en NcROP5 qui a été construite expérimentalement, présentaient des capacités d'invasion cellulaire considérablement plus faibles, une prolifération réduite et virulence par rapport à la souche Nc-1 de type sauvage suggérant un rôle clé de cette protéine au sein des mécanismes d'invasion cellulaire ***(MA et al., 2017).***

II.11.4. Protéines des granulaires denses (GRA)

Les protéines GRA sont sécrétées par des vésicules appelées granules denses qui se trouvent dans tout le parasite mais généralement concentré à l'extrémité apicale. Quinze protéines GRA ont été identifiées chez *N. caninum* ***(REID et al., 2012)***, seuls quelques-uns ont été caractérisés à ce jour. Il s'agit notamment de NcGRA1 ***(ATKINSON et al., 2001)***, NcGRA2 ***(ELLIS et al., 2000),*** NcGRA6 ***(LALLY et al., 1996b),*** NcGRA7 ***(HEMPHILL et al., 1998 ; ALVAREZ-GARCIA et al., 2007)*** et NcMAG1 ***(GUIONAUD et al., 2010)***. NcGRA2 et NcGRA7 sont abondamment exprimés par les tachyzoïtes de *N. caninum* et sécrétés pendant et après l'invasion de la vacuole parasitophore ***(VONLAUFEN et al.,2004)***. La protéine NcGRA7 a été le plus utilisée avec succès pour le développement de tests afin de détecter des anticorps spécifiques dans les sérums de bovins infectés ***(AGUADO-MARTINEZ et al., 2008).*** De plus, comme *T. gondii*, *N. caninum* exprime un nucléoside triphosphate de type I

hydrolase (NTPase) qui est également localisée dans les granules denses (***MERCIER ET CESBRON-EDELAUW, 2015***).

II.12. Expression spécifique des antigènes de *N. caninum*

N. caninum est caractérisé par une expression différentielle des protéines entre les tachyzoïtes et bradyzoïtes (***KANG et al., 2008b***) en fonction des variations de transcription génique entre les deux stades parasitaires ***(KANG et al., 2008a).*** Semblable à *T. gondii*, les tachyzoïtes et les bradyzoïtes de *N. caninum* peuvent être différenciés par microscopie électronique à transmission (TEM), basée sur des différences de morphologie ultrastructurale, ou par détection des antigènes exprimés selon un stade spécifique ***(VONLAUFEN et al., 2004).*** Une expression différentielle des antigènes de surface, qui semble être une stratégie pour échapper au système immunitaire de l'hôte, a été observée chez la plupart des parasites apicomplexes. Chez *T. gondii*, les principaux antigènes de surface TgSAG1 et TgSAG2 sont spécifiquement exprimés au stade tachyzoïte ***(KASPER, 1989).*** De même, les antigènes surfacent immunodominante NcSAG1 et NcSRS2 de *N. caninum* sont fortement exprimés au stade tachyzoïte et ces antigènes sont diminués pendant la conversion du stade tachyzoïtes en bradyzoïte ***(VONLAUFEN et al., 2002).*** Bien que fortement exprimé par le stade tachyzoïte, NcGRA7 est également exprimé par le stade de la bradyzoite. Il a été démontré que l'antigène est localisé de manière différentielle dans le tachyzoïte et les stades bradyzoïte de *T. gondii* ***(TORPIER et al., 1993)*** et il a été détecté à la périphérie des kystes tissulaires chez *N. caninum* ***(FUCHS et al., 1998, VONLAUFEN et al., 2004).*** En plus, de la protéine NcGRA7, d'autres protéines granulaires denses, telles que NcGRA1 et NcGRA2, ont été détectées dans la paroi du kyste tissulaire de *N. caninum* en utilisant l'immunofluorescence ***(KANG et al., 2008a, KANG et al., 2008b).*** Des différences dans les profils d'expression de ces antigènes ont joué un rôle déterminant dans la discrimination entre tachyzoïtes et bradyzoïtes *in vitro*. Par ailleurs, NcGRA9 est fortement exprimé par le stade bradyzoite ***(MARUGAN-HERNANDEZ et al., 2010).*** De même, TgGRA9, l'orthologue de NcGRA9 chez *T. gondii*, a été abondamment exprimée par le stade bradyzoite et efficacement sécrétée dans la matrice de la paroi du kyste ***(CAFFARO et al., 2013).*** Cependant, cette protéine antigénique est exprimée par les tachyzoïtes et les bradyzoïtes de N. *caninum* ***(MARUGAN-HERNANDEZ et al., 2010)*** et de *T. gondii* ***(ADJOGBLE et al., 2004).*** De plus, la protéine NcMIC1 n'a pas été détectée dans les kystes tissulaires de *N. caninum*, cela suggère que l'expression de cette protéine MIC peut être considérablement réduite pendant la phase de repos du parasite ***(KELLER et al., 2002).*** L'immunomarquage à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux ainsi que l'analyse des bibliothèques d'ADNc a permis l'identification de

plusieurs antigènes spécifiques de bradyzoite ***(VONLAUFEN et al., 2004).*** Ceux-ci incluent NcSAG4 ***(FERNANDEZ-GARCIA et al., 2006)***, NcBSR4 ***(RISCO-CASTILLO et al., 2007),*** NcSRS9 ***(RISCO-CASTILLO et al., 2011)***, NcSRS13 ***(REID et al., 2012),*** NcMAG1 ***(GUIONAUD et al., 2010)*** et NcBAG1 ***(KOBAYASHI et al., 2013).*** Plusieurs antigènes spécifiques du bradyzoite sont partagés entre *N. caninum et T. gondii.* Il a été démontré que NcSAG4 et NcSRS6 sont surexprimés dans les bradyzoïtes de *T. gondii* ***(WASMUTH et al., 2012)*** et de *N. caninum* ***(FERNANDEZ-GARCIA et al., 2006).*** Il a été démontré que les anticorps polyclonaux dirigés contre TgBAG1 ont une réaction croisée avec les kystes tissulaires de *N. caninum* ***(TUNEV et al., 2002)***, dans lesquels, la protéine NcBAG1 est fortement exprimée ***(KOBAYASHI et al., 2013).*** Cependant, d'autres antigènes considérés comme spécifiques des tachyzoïtes de *T. gondii* ont montré une surexpression chez les bradyzoïtes de *N. caninum.* Par exemple, la protéine TgROP9 a été signalée comme étant une protéine antigénique spécifique du tachyzoïte impliquée dans les premiers stades de l'invasion cellulaire chez *T. gondii*, alors que son orthologue chez *N. caninum* (NcROP9) est fortement exprimée au stade bradyzoïte ***(MARUGAN-HERNANDEZ et al., 2011).*** Néanmoins, la richesse des informations concernant le répertoire antigénique du stade bradyzoite est limité. Cela est probablement dû aux faibles niveaux de production de bradyzoite *in vivo* ***(MCGUIRE et al., 1997b)*** et *in vitro* ***(WEISS et al., 1999)***. Contrairement à *T. gondii*, dans lequel des antigènes spécifiques aux sporozoïtes ont été identifiés ***(HILL et al., 2011),*** il existe peu d'informations sur les antigènes qui pourraient être spécifiquement exprimés par le stade sporozoïte de *N. caninum*.

II.13. Diagnostic de la néosporose bovine

Bien que les données épidémiologiques et les antécédents cliniques, tels que l'avortement dans le troupeau et l'âge gestationnel au moment de l'avortement, permettent uniquement de suspecter la néosporose, des méthodes de laboratoire sont nécessaires pour un diagnostic définitif ***(MCALLISTER, 2016).*** Il est important de faire la différence entre l'identification de *N. caninum* comme cause d'avortement et la présence des animaux infectés par le protozoaire. La distinction entre les animaux infectés et les animaux non infectés est la base de la gestion des maladies et un certain nombre d'outils de diagnostic ont été développés à cette fin ***(DUBEY ET SCHARES, 2006).*** Étant donné que la détection directe de *N. caninum* chez les fœtus avortés n'élimine pas les autres causes d'avortement, une analyse précise de la gravité des lésions et l'exclusion des autres causes est requise. Par conséquent, le diagnostic de la néosporose bovine devrait être abordé dans le cadre d'un plan de diagnostic plus large d'avortement dans lequel les principales causes de mortalité fœtale chez les bovins doivent

être incluses ***(DUBEY et al., 2007).*** Dans certains cas, le diagnostic de la néosporose bovine ne peut être posé au niveau du troupeau qu'en combinant les informations obtenues en examinant les fœtus avortés, avec les sérologies maternelles et en comparant la présence d'anticorps spécifiques de *N. caninum* lors de l'avortement et les animaux non avortés. Une augmentation statistiquement significative du risque d'avortement des vaches séropositives suggèrerait un problème de néosporose bovine en cours ***(MCALLISTER, 2016).*** L'examen des fœtus avortés et les tests sérologiques doivent se compléter lorsque c'est possible.

II.13.1. Examen des fœtus avortés

L'examen direct des fœtus avortés offre les plus grandes chances d'atteindre un diagnostic étiologique quelle que soit la cause de l'avortement bovin ***(MCALLISTER, 2016).*** Les lésions macroscopiques sont rares dans les avortements associés à *N. caninum*, bien que l'hydrocéphalie, hypoplasie du cervelet et de la moelle épinière ainsi que des foyers dispersés de nécroses pâles à foncés des nécroses du cerveau, de la moelle épinière, du cœur et des muscles squelettiques ont été rapportées ***(DUBEY et al., 1998, DUBEY et SCHARES 2006).*** Des fœtus entiers et des cotylédons placentaires, ou des échantillons de tissus, peuvent être soumis à des analyses histopathologiques, sérologiques et moléculaires.

II.13.1.1. Histopathologie

Chez les bovins, les lésions sont fréquemment observées dans le cerveau, le cœur, le foie et les muscles squelettiques ***(WOUDA et al., 1997 ; DUBEY et al., 2007).***

II.13.1.1.1. Lésions macroscopiques

Chez le bœuf , Les lésions macroscopiques sont rares, mais peuvent être présentes dans le cœur, le muscle squelettique ou le cerveau sous forme de foyers blanchâtres. Des petits foyers de décolorations tissulaires localisés peuvent être observés dans les cotylédons placentaires ***(DE MEERSCHMAN et LOSSON, 1998 ; DUBEY et SCHARES, 2006).***

II.13.1.1.2. Lésions microscopiques

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. Chez l'espèce bovine, les lésions liées à la néosporose ont fait l'objet de plusieurs publications ***(DUBEY et SCHARES, 2006 ; PESCADOR et al. 2007 ; NISHIMURA et al., 2013a , NEMATOLLAHI et al., 2013 KAMALI et al., 2014).*** 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.,1991).*** Des foyers de nécrose peuvent être observés au niveau du cerveau, du cœur et du foie ***(BARR et al.,1990 ; 1991 ; 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 tachyzoïte dans les trophoblastes ***(DUBEY et SCHARES, 2006).*** Il est difficile de mettre en évidence histologiquement *N. caninum* chez des veaux même ceux montrant des signes cliniques ***(DE MEERSCHMAN et al., 2005 ; DUBEY et SCHARES, 2006).*** *N. caninum* n'a pu être identifié sur des coupes histologiques que sur un seul des 6 veaux nés avec des signes neurologiques et ayant produit des anticorps précolostraux ***(DE MEERSCHMAN et al., 2005).*** Une encéphalomyélite est la lésion prédominante à la fois chez les veaux nés vivants avec des signes cliniques ou ceux ne présentant des signes cliniques que juste après la naissance (2 semaines) ***(BARR et al., 1991 ; BRYAN et al., 1994 ; DUBEY et SCHARES, 2006).*** Même si la sensibilité et la spécificité de l'histopathologie fœtale sont considérées comme élevées ***(OTTER et al., 1997),*** une coloration classique à l'hématoxyline-éosine ne donne que la possibilité de visualiser les lésions éventuellement présentes et ne permet que rarement d'observer les tachyzoïte qui sont peu nombreux, souvent morts et difficilement identifiables ***(SHIVAPRASAD et al., 1989 ; NIETFELD et al., 1992 ; BERGERON et al., 2001).*** L'utilisation de l'immunohistochimie améliore fortement la sensibilité et la spécificité de la technique ***(LINDSAY et DUBEY, 1989 ; JENKINS et al., 2002).***

II.13.1.2.Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est fréquemment utilisée parallèlement à l'analyse des lésions histopathologiques pour améliorer le diagnostic, utilisant des anticorps monoclonaux ou polyclonaux reconnaissant les tachyzoïtes de *N. caninum* ou les antigènes bradyzoïtes ***(UZEDA et al., 2013).*** Cette technique a l'avantage de permettre l'évaluation du nombre, la distribution et la localisation micro-anatomique des agents pathogènes dans les sections des tissus sections ***(RAMOS-VARA et al., 2008).*** L'IHC est particulièrement utile lorsque les lésions caractéristiques de néosporose ne sont pas évidentes ***(BOGER et HATTEL 2003).*** Les tachyzoïte sont fréquemment observés au sein du cerveau (85 % des fœtus examinés) mais ils peuvent aussi être détectés dans le foie (26 %) et le cœur (14 %). Des kystes tissulaires peuvent être également mis en évidence dans 21% des cerveaux de fœtus examinés ***(WOUDA et al., 1997).*** Néanmoins, cette technique est laborieuse et reste assez peu sensible ***(DUBEY, 2003)*** et nécessite donc la réalisation de plusieurs coupes à différents endroits de l'organe ***(WOUDA et al., 1997).*** En pratique, le tissu infecté est enrobé en bloc de paraffine et de fines

sections sériées sont réalisées. Les coupes sont déparaffinées et un sérum spécifique de *N. caninum* est appliqué sur la lame. Les anticorps fixés sont révélés par un anticorps conjugué à une enzyme. La réaction enzymatique provoque la formation d'un précipité coloré à l'endroit de fixation des anticorps conjugués. Cette approche a été utilisée pour mettre en évidence les tachyzoïtes et kystes à bradyzoïtes de *N. caninum* dans des sections de cerveaux d'avortons bovins ***(DE MEERSCHMAN et al., 2002)*** ou chez d'autres espèces ou d'autres tissus ***(BUXTON et al., 1997 ; 1998 ; PIERGILLI FIORETTI et al., 2000***). La qualité dépend de la spécificité des anticorps. D'autre part, si on utilise un anticorps à la peroxydase il faut éliminer la peroxydase endogène du tissu avant de réaliser le marquage. Dans la majorité des cas, un sérum polyclonal à partir de lapins immunisés avec des tachyzoïtes de *N. caninum* dérivés de cultures cellulaires est utilisé***(DUBEY et LINDSAY, 1996).*** Une détection spécifique immunohistochimique pour les tachyzoïtes et les kystes tissulaires de *N. caninum* a déjà été réalisée. Elle était basée sur un anticorps monoclonal spécifique du stade kystique ***(COLE et al., 1993 ; 1994).*** Du fait de l'autolyse rapide des avortons, le tissu cérébral doit être fixé dans du formol à 10% même à l'état semi-liquide afin de réaliser les examens histologique et immunohistochimique (IHC) ***(DUBEY, 1999).*** Néanmoins, il faut signaler que l'autolyse peut diminuer la performance de ces tests ***(ANDERSON et al., 2000).*** En raison de la faible sensibilité de la coloration immunohistochimique, de nombreux auteurs ont appliqué la PCR pour amplifier des séquences de *N. caninum* à partir des tissus fœtaux frais, congelés, fixés au formol ou enrobés dans de la paraffine ***(BASZLER et al., 1999 ; JENKINS et al., 2002. KAMALI et al.2014 ; NEMATOLLAHI et al., 2013 ; AL-SHAELI et al.2020).***

II.13.1.3. Détection moléculaire de *N. caninum*

Plus récemment, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est de plus en plus appliquée à la détection directe de l'ADN (ou ARN) de *N. caninum* dans des aliments frais, congelés, des tissus fœtaux fixés au formol et inclus dans de la paraffine ***(DUBEY et SCHARES 2006).*** Le cerveau foetal est généralement considéré comme le meilleur échantillon pour l'analyse par PCR, suivi du cœur, du foie et placenta ***(DUBEY, 2003).*** Néanmoins, les protocoles d'amplification de l'ADN parasitaire à partir de différents échantillons tels que le liquide céphalo-rachidien (LCR) ***(BUXTON et al., 2001)*** et du liquide amniotique ont été décrits ***(HO et al., 1997)***. En raison de sa sensibilité analytique, la PCR est particulièrement utile pour le diagnostic des avortements bovins lorsque les tissus fœtaux et placentaires ont subi une autolyse et l'histopathologie ne serait pas réalisable ***(MCALLISTER, 2016)***. La probabilité de détecter *N. caninum* dans des tissus fœtaux peut varier selon le stade gestationnel auquel

la mort foetale survienne. Dans une étude, la fréquence des cas positifs à la PCR dans les échantillons de cerveau, de cœur, de rein et de poumon étaient significativement plus élevés chez les fœtus avortés au cours du premier trimestre par rapport aux fœtus avortés au cours du deuxième et troisième trimestre ***(COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006).*** Chez les fœtus avortés à la fin de la gestation (troisième trimestre), l'ADN de *N. caninum* était presque exclusivement détecté dans le cerveau du fœtus et seulement sporadiquement dans le diaphragme, le cœur et les reins. Ces résultats ont été attribués à des variations de la charge parasitaire dans certains tissus fœtaux pendant la gestation ***(COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006)*** et sont également susceptibles de refléter le développement de la réponse immunitaire fœtale pendant la gestation. Une variété de protocoles de PCR a été établie. Ceux-ci comprennent la PCR conventionnelle ***(HOLMDAHL et MATTSSON, 1996)***, nichée ***(BUXTON et al., 1998)*** et multiplex ***(DUBEY et al., 2017).*** Des PCR quantitatives ont également été développées et ont l'avantage de permettre l'estimation de la charge parasitaire dans les tissus des avortons ***(REITT et al., 2007 ; NISHIMURA et al., 2013a ; REGIDOR-CERRILLO et al., 2014).*** Les séquences d'ADN cibles rapportées englobent : la région ITS1(internal transcribe spacer) ***(HOLMDAHL*** et ***MATTSSON 1996, BUXTON et al., 1998),*** le gène Nc-5 ***(LIDDELL et al., 1999)***, l'ADN ribosomal 18S et 28S (ADNr) ***(FAZAELI et al., 2000),*** le gène HSP70 et le gène 14-3-3 ***(LALLY et al., 1996a).*** Les régions ITS1 et Nc-5 sont les plus fréquemment cités dans la littérature ***(SINNOTT et al., 2017).*** En outre, les méthodes de PCR sont des outils clés pour l'étude de l'hétérogénéité génétique de *N. caninum* qui peuvent fournir des informations épidémiologiques et phylogénétiques supplémentaires ***(CAMPERO et al., 2015, MEDINA-ESPARZA et al., 2016)***, notamment avec la disponibilité actuelle du génome séquencé de *N. caninum* Liverpool (Nc-Liv) qui pourrait faciliter le développement d'autres protocoles de PCR ***(GOODSWEN et al., 2013).***

II.13.1.4. Détection d'anticorps dans les fluides fœtaux

Au-delà du stade d'immunocompétence fœtale (de 110 à 120 jours de gestation***) (SWIFT et KENNEDY, 1972)***, la plupart des fœtus, développent des anticorps spécifiques réponse à l'invasion transplacentaire des tachyzoïtes de *N. caninum* ***(ALVAREZ-GARCIA et al., 2003, BARTLEY et al., 2004)***. Les anticorps anti *N. caninum* peuvent être détectés chez le fœtus dans le sang, les liquides pleuraux et péritonéaux ainsi que dans le contenu de la caillette ***(DUBEY et SCHARES, 2006)***. Les immunoglobulines détectées sont majoritairement IgG1, bien que des IgG2 puissent également être détectées ***(ANDRIANARIVO et al., 2001).*** Il a été rapporté que la sensibilité de la sérologie fœtale est faible lorsqu'elle est évaluée par l' IFAT ou le test ELISA, ***(SONDGEN et al., 2001, ALVAREZ-GARCIA et al., 2003, PEREIRA-***

BUENO et al., 2003). Dans une étude sur des avortons, seulement 25% des fœtus présentant des lésions histopathologiques évocatrices de néosporose étaient également séropositifs ***(PEREIRA-BUENO et al., 2003).*** Par conséquent, les résultats séronégatifs du fœtus n'excluent pas nécessairement *N. caninum* comme agent causal. Une sensibilité réduite peut résulter de l'immunocompétence fœtale ou de la dégradation des immunoglobulines au cours du processus d'autolyse qui suivent la mort et l'expulsion du fœtus avorté ***(WOUDA et al., 1997).*** Néanmoins, la présence d'anticorps contre *N. caninum* dans les liquides fœtaux représentent le premier indicateur de la multiplication spécifique de *N. caninum* chez le fœtus ***(DE MEERSCHMAN et al., 2002).*** Parallèlement aux avortons et au placenta, la soumission d'un échantillon de sérum de la mère avortée pour l'analyse sérologique est fortement recommandée dans le cadre d'une stratégie de diagnostic de la néosporose bovine et des avortements bovins en général ***(MCALLISTER, 2016).***

II.13.2. Diagnostic *in vivo* de la néosporose bovine

La détection d'anticorps spécifiques dans le sérum, le plasma ou le lait des bovins indique une infection à *N. caninum* ***(DUBEY, 2003)*** et est actuellement considérée comme la principale méthode de diagnostic de la néosporose bovine chez les animaux vivants ***(ALVAREZ-GARCIA et al., 2013).*** Bien que la détection de l'ADN de *N. caninum* par PCR dans le sang ***(OKEOMA et al., 2004. FERRE et al., 2005)***, le sérum ***(MCINNES et al., 2006b)***, le sperme ***(FERRE et al., 2005***, ***ORTEGA-MORA et al., 2003***, ***SERRANO-MARTINEZ et al., 2007b***), le colostrum et le lait ***(MOSKWA et al., 2007)*** ainsi que l'analyse des cytokines pro-inflammatoires comme indicateurs d'exposition au parasite **(ALMERIA et LOPEZ-GATIUS, 2015)** pourraient également s'appliquer *in vivo*, ces marqueurs d'infection sont confinés au domaine de la recherche en raison de leur caractère transitoire.

II.13.2.1. Techniques sérologiques

De nombreuses techniques ont été développées pour la détection des anticorps spécifiques de *N. caninum*. Ceux-ci englobent une grande variété, tels : La technique de dosage d'immuno-absorption par enzyme liée (ELISA), le test d'immunofluorescence indirecte (IFAT), le test d'agglutination *Neospora* (NAT), l'analyse par Western blot (WB) et le test immuno-chromatographique ***(SINNOTT et al., 2017).***

II.13.2.1.1. Immuno-absorption par enzyme liée (ELISA)

L'ELISA est, avec la PCR, la méthode de diagnostic qui a connu les développements les plus importants au cours des dernières années. Selon la nature antigénique, les différentes techniques ELISA sont basées soit sur des antigènes de surface des tachyzoïtes de *N. caninum* ***(WILLIAMS et al., 1997)*** soit sur des tachyzoïtes lysés (antigènes natifs partiellement

purifiés) (***PARE et al., 1995; DUBEY et al., 1996; OSAWA et al.,1998 ; WOUDA et al., 1998 ; SCHARES et al., 1999)*** ou bien des antigènes recombinants ***(LALLY et al., 1996*** ; ***LOUIE et al., 1997).*** Certaines techniques permettent de juger de l'avidité des anticorps produits ***(BJÖRKMAN et al.,1999)*** ; d'autres reposent sur l'inhibition compétitive par des anticorps monoclonaux spécifiques du parasite ***(BASZLER et al., 1996 ; 2001 ; MCGARRY et al., 2000)***. Des antigènes de tachyzoïtes incorporés dans des complexes stimulants ou ISCOM ont aussi été utilisés ***(BJÖRKMAN et al., 1994 ; 1997).*** Dans beaucoup de cas, l'ELISA est le test de choix du fait de sa simplicité et de sa large diffusion au sein des laboratoires de diagnostic ***(LOUIE et al., 1997).*** Il présente aussi, l'avantage d'une automatisation aisée et d'une lecture plus objective que celle de l'IFAT. Il s'agit ainsi d'une technique bien adaptée pour le dépistage réalisé sur un grand nombre d'échantillons lors d'enquêtes sérologiques (***DE MEERSCHMAN et LOSSON, 1998*** ; ***BJÖRKMAN et UGGLA, 1999).*** Un premier ELISA pour détecter les anticorps spécifiques de *N. caninum* a été décrit par ***BJÖRKMAN et collaborateurs (1994),*** et depuis divers tests immunoenzymatiques (ELISA) ont vu le jour. De nombreuses variantes de la technique existent mais le principe de base est le suivant : l'antigène est fixé dans un puits d'une plaque multi-puits, le sérum est ajouté et, après lavage, la présence d'anticorps spécifiques est mise en évidence grâce à un anticorps anti-espèce conjugué à une enzyme (peroxydase, phosphatase alcaline). La liaison de l'antigène conjugué est mise en évidence par une réaction enzymatique qui génère un produit coloré. La densité optique (DO) à la longueur d'onde adéquate est alors déterminée par un spectrophotomètre. Un seuil de positivité (*cut off*) est déterminé pour différencier les positifs des négatifs. La spécificité et la sensibilité des tests ELISA basées sur les antigènes intracellulaires ont été remises en question dans le cas de *T. gondii* et *N. caninum* ***(BJÖRKMAN et UGGLA, 1999).*** Il a été suggéré alors que les tests sérologiques basés sur les antigènes membranaires se montraient plus spécifiques aux parasites ***(UGGLA et BUXTON, 1990).*** En effet, les antigènes membranaires de *N. caninum* comme ceux de *T. gondii* sont hautement immunogènes et induisent une réponse humorale spécifique chez les individus naturellement infectés ***(WILLIAMS et al., 1997).*** Pour limiter l'intervention des antigènes intracellulaires, des tachyzoïtes totaux fixés peuvent être adsorbés sur les puits de la microplaque ***(WILLIAMS et al., 1997).*** Alternativement, les antigènes membranaires concernés peuvent être enrichis et incorporés dans des ISCOM ***(LÖVGREN et al., 1987 ; BJÖRKMAN et al., 1994).*** Une autre approche en vue d'augmenter la spécificité du test est la réduction du nombre d'antigènes par l'utilisation de protéines recombinantes bien définies ***(LALLY et al., 1996b ; LOUIE et al., 1997),*** ou par capture d'un antigène

spécifique par un anticorps monoclonal ***(DUBEY et al., 1997).*** Les anticorps secondaires les plus communément utilisés en ELISA sont des antisérums polyclonaux dirigés contre les immunoglobulines des espèces animales investiguées. Toutefois, dans certains des systèmes ELISA, des anticorps monoclonaux ont été utilisés pour augmenter la spécificité et la sensibilité du test ***(BJÖRKMAN et al., 1994 ; 1997 ; WILLIAMS et al.,1997).*** En général, les différents ELISA ne donnent pas lieu à des réactions croisées vis-à-vis des sporozoaires voisins ***(TREES et al., 1994).*** Néanmoins, dans certains cas, des réactions croisées vis-à-vis de *Sarcocystis sp* ont été signalées ***(PARE et al., 1995b ; Dubey et al., 1996b ; DE MEERSCHMAN et LOSSON, 1998).***

II.13.2.1.1.1.Tachyzoïtes complets fixés

L'ELISA le plus simple repose sur l'utilisation de tachyzoïtes totaux comme antigène. Un ELISA basé sur l'utilisation de tachyzoïtes de la souche Nc-Liv fixés au formol a été développé. Ce dernier conserve intact les tachyzoïtes et préserve la conformation des antigènes de surface ***(WILLIAMS et al., 1997).*** Cet ELISA a connu un développement commercial : la trousse MASTZYME ELISA (MAST diagnostics) ***(WILLIAMS et al., 1997 ; BJÖRKMAN et UGGLA, 1999).*** Dans ce type d'ELISA, ce sont principalement les antigènes membranaires de surface et probablement les antigènes sécrétoires adhérant à la surface qui sont exposés ***(WOUDA et al., 1998b ; BJÖRKMAN et UGGLA, 1999).*** Ce test a été développé pour contourner le problème des réactions croisées rencontrées avec les tests basés sur des lysats antigéniques ***(WILLIAMS et al., 1997).*** Toutefois, la comparaison de ce test avec deux autres ELISA basés sur des lysats de tachyzoïtes, a montré que l'utilisation de tachyzoïtes totaux comme antigènes pouvait sous-estimer la séroprévalence de *N. caninum* dans un troupeau ***(WOUDA et al., 1998b).*** En effet, le système Mastazyme Neospora semble moins efficace lorsque les titres spécifiques sont faibles comme cela peut être le cas chez certains bovins infectés chroniquement ***(BJÖRKMAN et UGGLA, 1999).***

II.13.2.1.1.2. Lysat de tachyzoïtes

Les lysats de tachyzoïtes totaux contenant un mélange d'antigènes intracellulaires et membranaires sont préparés soit par sonication ***(PARE et al., 1995b ; OSAWA et al., 1998)*** ou bien par solubilisation avec un détergent ***(WOUDA et al., 1998b).*** Un ELISA utilisant un extrait brut de tachyzoïtes totaux de *N. caninum* a été développé et très largement utilisé (***PARE et al., 1995b ; THURMOND et HIETALA, 1997b ; MOEN et al., 1998 ; GOTTSTEIN et al.,1998).*** Il a montré une bonne corrélation avec les sérums de bovins qui ont des titres en IFAT de 1/1280 (***PARE et al., 1995a*** ; ***DUBEY et LINDSAY, 1996).*** De plus, ce test a été adopté pour utilisation chez les bovins, ovins et caprins ***(BJÖRKMAN et UGGLA,***

1999). Aussi, ***WOUDA et collaborateurs (1999a)*** ont montré que l'utilisation d'extraits antigéniques soniqués s'avèrent d'une plus grande sensibilité pour le dépistage chez les troupeaux bovins. D'autres laboratoires utilisant la même approche (lysat antigénique) rapportent des sensibilités et spécificités de 92%-98% et 87%-100% respectivement ***(WOUDA et al., 1998b ; MOEN et al., 1998 ; OSAWA et al., 1998).*** Un test basé sur des antigènes solubles après sonication a servi de base aux trousses commerciales IDEXX (IDEXX Laboratories) (HerdChek Anti-Neospora : IDEXX Laboratories) ***(SCHARES et al., 1998 ; WU et al., 2002***) et Biovet (Biovet Laboratories) ***(WU et al., 2002).*** Ces deux tests ont été validés par rapport à l'immunoblotting, leurs performances étaient comparables. Du fait de leur grande sensibilité comparée à l'IFAT, ils ont été alors recommandés pour être utilisés comme test de dépistage d'animaux infectés par *N. caninum* dans les troupeaux bovins ***(SCHARES et al., 1998 ; WU et al., 2002).*** La trousse CHEKIT (Bommeli diagnostics ou Idexx laboratories) basée sur un lysat de tachyzoïtes solubilisés a été utilisée pour suivre la sérologie des vaches laitières durant la gestation ***(HÄSLER et al., 2006a).*** Un ELISA basé sur des antigènes obtenus via le traitement des tachyzoïtes par un détergent a été développé ***(WOUDA et al., 1998b).*** Aucune réaction croisée détectable n'a été signalée vis-à-vis de *T.gondii*, *S. cruzi* *C.parvum*, *B.bigemina*, *B.divergens* et *E.alabamensis*. En effet, la solubilisation des antigènes produit une sensibilité élevée; des résultats similaires ont été obtenus avec la solubilisation des antigènes de *T.gondii* ***(HUGHES et al., 1982).*** Cependant, l'utilisation d'antigènes obtenus par sonication des tachyzoïtes totaux, révèle certaines réactions croisées sur des sérums de veaux infectés expérimentalement par *Sarcocystis cruzi* ***(DUBEY et al., 1996b). PARE et collaborateurs (1998)*** utilisent le même type de test et ne signalent pas de réactions croisées vis-à-vis de *T.gondii*.

II.13.2.1.1.3. Immunostimulating complex (ISCOM)

Les ISCOM sont des particules sphériques de 30-40 nm de diamètre composées de saponine, de phospholipides, de cholestérol et de protéines antigéniques ***(BJÖRKMAN et al., 1994; 1997)***. Elles imitent la structure de la membrane plasmique. Comme leur nom l'indique, les ISCOM sont efficaces dans la présentation des antigènes au système immunitaire. Ils sont surtout utilisés pour solubiliser les antigènes et pour servir d'adjuvant lors des immunisations. Néanmoins, les antigènes incorporés dans les ISCOM peuvent aussi être utilisés en ELISA ***(BJÖRKMAN et al., 1994 ; 1997; BJÖRKMAN et LUNDEN, 1998).*** Dans le cas de la néosporose, le premier ELISA ISCOM développé concernait l'espèce canine ***(BJÖRKMAN et al., 1994)***. Par la suite, ce test a été utilisé sur des sérums et échantillons de lait chez les bovins ***(BJÖRKMAN et al., 1997).*** Les ISCOM constituent un outil conçu pour sélectionner

les antigènes amphipathiques tels que les protéines membranaires de tachyzoïtes ***(HÖGLUND et al., 1989 ; LUNDEN et al., 1996).*** Autrement dit, cette technique permet de bien solubiliser les protéines de membrane afin de contourner le problème de bruit de fond engendré par un ELISA conventionnel employant des préparations d'antigènes bruts et un antisérum polyclonal. Ceci permet aussi d'éviter les réactions croisées avec d'autres parasites proches de *N. caninum* ***(BJÖRKMAN et al.,1994 ; 1997 ; LUNDEN et al., 1996 ; DUBEY et al., 1997 ; BJÖRKMAN et UGGLA, 1999).*** Les analyses par immunoblotting révèlent que les ISCOM issus de *N. caninum* contiennent plusieurs antigènes mais considérablement moins que les extraits bruts de *N. caninum* ***(BJÖRKMAN et al., 1997).*** En outre, les antigènes de 31-35 kDa et 45-52 kDa apparaissent être plus concentrés dans les ISCOM ***(BJÖRKMAN et al., 1997).*** Plus récemment, ce test a été utilisé pour la détection d'anticorps spécifiques de *N. caninum* dans le lait de vache ***(FRÖSSLING et al., 2006).***

II.13.2.1.1.4. Antigènes recombinants ou purifiés

Le screening de librairies de cDNA permet de détecter des clones qui expriment des protéines utiles pour de futurs vaccins ou pour des tests diagnostiques ***(BJÖRKMAN et UGGLA, 1999)***. Pour purifier l'antigène, une partie d'un cadre de lecture codant pour un antigène est amplifiée par PCR et clonée dans un vecteur d'expression en fusion avec un cadre de lecture codant pour un peptide facilement purifiable (Glutathion-S-tranférase, His-Tag). Après induction, la protéine de fusion formée est purifiée par chromatographie d'affinité et utilisée comme antigène en ELISA. Pour améliorer la sensibilité et la spécificité du système ELISA, une telle approche a été utilisée pour réaliser un ELISA basé sur l'antigène NcSAG1 ***(HOWE et al., 2002 ; CHAHAN et al., 2003)***, sur les antigènes de granules denses NcDG1 et NcDG2 ***(LALLY et al., 1996 ; JENKINS et al., 1997 ; VENTURINI et al., 1999),*** sur deux protéines recombinantes (N54 et N57) ***(LOUIE et al., 1997),*** ou sur une protéine recombinante de l'antigène de surface NcSRS2 ***(NISHIKAWA et al., 2001c).*** De façon alternative, l'antigène peut être purifié par chromatographie d'affinité en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène. Cette approche a été appliquée pour l'antigène de surface p38 (NcSRS2) purifié de *N. caninum* ***(SCHARES et al., 1998).*** La protéine p38 semble être présente uniquement dans les tachyzoïtes et non dans les bradyzoites **(SCHARES *et al.*, 1999a)** et elle représente de ce fait un bon candidat pour le développement d'un test de diagnostic qui permet de détecter l'infection dans ses phases aiguës ou après sa réactivation ***(SCHARES et al. , 2000).*** Récemment, deux ELISA basés sur des protéines recombinantes utilisant la protéine NcGRA7 des granules denses et la protéine NcSAG4 spécifique du stade bradyzoïte ont été développés et ont donné des résultats concordants ***(AGUADO-MARTINEZ et al., 2008).*** Ces

résultats suggèrent que les niveaux d'anticorps anti-rNcGRA7 peuvent être indicatifs d'une infection aiguë (primo-infection, réinfection et recrudescence) alors que la présence d'anticorps anti-rNcSAG4 peut être associée à une infection chronique et être un bon indicateur de l'établissement de l'infection (du stade tachyzoïte au stade bradyzoïte). La protéine NcGRA7 est un antigène immunodominant partagé par les stades tachyzoïte et bradyzoïte ***(VONLAUFEN et al., 2004*** ; ***ALVAREZ-GARCIA et al., 2007),*** alors que NcSAG4 est la première protéine spécifique du stade bradyzoïte employée dans un test sérologique ***(FERNANDEZ-GARCIA et al., 2006).*** La production et caractérisation d'antigènes recombinants tendent a améliorer la sensibilité et la spécificité des tests par rapport à un mélange d'antigènes mal définis ***(LALLY et al., 1996).*** En outre, les tests sérologiques basés sur un seul antigène de surface immunodominant bien défini peuvent être supérieur en terme de répétabilité, de reproductibilité, et d'une production standardisée plus aisée par rapport à des mélanges antigéniques obtenus par lyse parasitaire. Les antigènes recombinants ont l'avantage supplémentaire sur les antigènes natifs de pouvoir être produits en plus grandes quantités ***(LOUIE et al., 1997 ; SCHARES et al., 2000 ; HOWE et al., 2002)***. En outre, l'ELISA basé sur l'usage de protéines recombinantes possède certains avantages sur l'ELISA de type compétitif ***(BASZLER et al., 1996).*** Dans ce dernier un seul épitope spécifique de Neospora est utilisé alors que le premier repose sur l'intervention de multiples épitopes spécifiques de *N. caninum*. Le problème de l'utilisation d'antigènes purifiés réside dans le choix d'un antigène qui doit être exprimé de façon constitutive par les différents stades du parasite. Certains auteurs recommandent l'utilisation d'un mélange d'antigènes purifiés afin d'augmenter la sensibilité du test ***(GROSS et al., 2004).***

II.13.2.1.1.5. ELISA de compétition (CI ELISA)

Plusieurs ELISA dits de compétition ***(BASZLER et al., 1996; McGarry et al., 2000 ; BASZLER et al., 2001)*** ont été développés afin d'éliminer la nécessité d'un anticorps secondaire spécifique de l'espèce testée. Dans un tel test, les sérums à analyser sont ajoutés aux plaques recouvertes d'antigène. Après incubation, les plaques sont lavées. Les anticorps spécifiques présents dans le sérum se seront liés aux antigènes fixés dans le puits. Ensuite, des anticorps spécifiques de *N. caninum* et conjugués à la peroxydase sont ajoutés. Les anticorps conjugués fixés sont révélés par réaction immuno-enzymatique. Plus il y a d'anticorps spécifiques de *N. caninum* dans le sérum moins la réaction sera importante en raison de la compétition plus grande entre les anticorps du sérum et les anticorps conjugués ***(HEMPHILL et GOTTSTEIN, 2000).*** Un avantage de l'ELISA compétitif sur le système ELISA conventionnel, est que le premier estime le niveau des anticorps pour un épitope unique ce qui

le rend probablement plus spécifique. En outre, exceptés les anticorps antisouris-conjugués, les conjugués spécifiques de l'espèce ne sont pas nécessaires, ce qui rend ce type d'ELISA compétitif hautement modulable ***(BJÖRKMAN et UGGLA, 1999).*** Afin de combiner les avantages de l'ELISA basé sur l'utilisation d'un antigène recombinant et ceux de l'ELISA de compétition, un ELISA basé sur la protéine de surface de 65 kDa a été développé ainsi qu'un anticorps monoclonal spécifique ***(BASZLER et al., 1996).*** Ce type d'ELISA de compétition développé apparaît comme prometteur et utile pour le diagnostic des avortements à Neospora chez la vache ***(DE MEERSCHMAN et LOSSON, 1998).*** Aucune réaction croisée n'a été observée avec un ELISA compétitif sur des sérums de veaux infectés expérimentalement par *S. cruzi* ***(BASZLER et al., 1996 ; DUBEY et al., 1997). BASZLER et collaborateurs (2001),*** ont validé un ELISA compétitif pour la détection des anticorps spécifiques de *N. caninum* dans du sérum bovin. Dans cette optique, ils ont modifié l'ELISA de compétition développé précédemment ***(BASZLER et al., 1996)*** par l'introduction d'un anticorps monoclonal spécifique dit de capture nouvellement décrit et d'un anticorps monoclonal conjugué compétiteur. L'ELISA-C ainsi modifié fournit une méthode modulable, simple et rapide pour identifier avec précisions l'infection à *N. caninum* chez les bovins et utilisant une seule valeur de seuil. Il a également permis de diminuer les liaisons d'anticorps non spécifiques ainsi que l'utilisation de sérum non dilué pour augmenter à la fois la sensibilité et spécificité ***(BASZLER et al., 2001).*** Ce test est commercialement disponible (cELISA, VMRD® Inc., Pullman, WA, USA) ***(BASZLER et al., 2001)*** et peut être utilisé chez les bovins et chiens ***(LASRI et al., 2004 ; KYAW et al., 2004 ; CAPELLI et al., 2004 ; 2006 ; AKTAS et al., 2005 ; PARADIES et al., 2007 ; PALAVICINI et al., 2007 ; MEENAKSHI et al., 2007 ; SHARMA et al., 2008). CAPELLI et collaborateurs (2006)*** ont montré une bonne spécificité de cet ELISA-C comparé à l'IFAT, ce qui permet son utilisation pour la confirmation des suspicions de néosporose clinique quand des niveaux élevés d'anticorps sont attendus; d'autre part la faible sensibilité de ce test ***(LASRI et al., 2004 ; CAPELLI et al., 2006)*** suggère de ne pas l'utiliser dans le cadre des enquêtes séroépidémiologiques visant à évaluer la prévalence de l'infection dans une population.

II.13.2.1.1.6. ELISA de type avidité

La présence d'anticorps de *N. caninum* reflète seulement l'exposition au parasite mais ne fournit pas d'information sur l'étape de l'infection (récente ou chronique) ***(JENKINS et al., 2000).*** Pour éviter cet inconvénient, un ELISA a été développé ; il mesure le degré d'affinité fonctionnel ou avidité des anticorps IgG contre *N. caninum* et permet de distinguer une infection récente d'une infection chronique ***(JENKINs et al., 2000 ; SCHARES et al., 2002).***

Les tests dits d'avidité sont basés sur le fait que les premiers anticorps spécifiques synthétisés après une infection primaire ont une faible affinité ou avidité pour les antigènes par rapport à ceux produits plus tard chez différentes espèces animales infectées ***(BJÖRKMAN et UGGLA, 1999 ; BJÖRKMAN et al., 1999 ; AGUADO-MARTINEZ et al., 2005).*** Au cours d'une immunisation, l'affinité et l'avidité des anticorps augmentent car les anticorps qui apparaissent ont des sites de plus en plus étroitement complémentaires des épitopes ***(Assim, 1989)***. L'ELISA d'avidité est basé sur cette propriété : un ELISA classique est effectué, ensuite les anticorps de faible avidité sont détachés par traitement à l'urée. L'absorbance est de nouveau mesurée et l'avidité est calculée ***(BJÖRKMAN et al 1999 ; BJÖRKMAN et UGGLA, 1999 ; MALEY et al., 2001 ; SAGER et al., 2003).*** Une telle approche a été menée par ***BJÖRKMAN et collaborateurs (1999)*** pour distinguer entre une infection récente et ancienne chez les bovins. Ils ont montré, lors d'une infection expérimentale chez le veau, qu'après trois semaines d'infection, l'avidité était de 9 à 18 %, alors que 24 semaines après l'infection elle était supérieure à 50 %. ***SAGER et collaborateurs (2003)*** ont évalué l'avidité des anticorps chez les vaches ayant avorté par un ELISA avidité IgG utilisant des antigènes somatiques de tachyzoïtes de *N. caninum*. Les résultats obtenus indiquent que les faibles avidités ne sont pas liées uniquement aux infections récentes mais peuvent aussi être un indicateur d'une augmentation du risque d'avortement chez la vache ***(SAGER et al., 2003).*** Trois ELISA d'avidité ont été développés utilisant les protéines de *N. caninum* incorporées dans des ISCOM, des extraits solubles à partir des tachyzoïtes ou la protéine purifiée p38 ***(BJÖRKMAN et al., 1999; 2005 ; SCHARES et al., 2002 ; SAGER et al., 2003).*** Ces tests ont été utilisés avec succès dans des études épidémiologiques pour distinguer entre les troupeaux avec des avortements d'allure épidémique (habituellement associés avec l'infection postnatale récente) dans lesquels la plupart des animaux montrent une faible avidité IgG ou les troupeaux avec des avortements endémiques (habituellement associés avec la recrudescence d'une infection chronique congénitale) dans lesquels la plupart des vaches montrent une forte avidité IgG ***(JENKINS et al., 2000 ; MCALLISTER et al., 2000 ; SCHARES et al., 2002).*** Cependant, ces tests ne permettent pas de distinguer une réinfection à *N. caninum* d'une recrudescence chez des bovins infectés chroniquement et par là, prédire le risque abortif ***(AGUADO-MARTINEZ et al., 2005).***

II.13.2.1.2. Test d'immunofluorescence indirecte des anticorps (IFAT)

Le test d'immunofluorescence indirecte des anticorps (Indirect Fluorescent Antibody Test : IFAT) est traditionnellement considéré comme test de référence pour le sérodiagnostic de *N. caninum.* Il a été utilisé pour la validation des tests sérologiques basés sur des principes

différents ***(ALVAREZ-GARCIA et al., 2003).*** Les protocoles IFAT sont chers, car ils sont laborieux et nécessitent la production *in vitro* de tachyzoïtes de *N. caninum* ***(SINNOTT et al., 2015).*** Il est important de noter que l'interprétation des résultats est subjective et peut être affectée par l'expérience et le niveau de formation de l'opérateur ***(CAMPERO et al., 2015).***
Les valeurs seuils de l'IFAT varient considérablement d'un laboratoire à l'autre, ce qui entrave la comparaison des résultats ***(SINNOTT et al., 2017).*** Bien qu'une dilution de sérum de 1:200 est couramment recommandée comme valeur seuil pour les vaches adultes, une gamme de dilutions différentes a été rapportée ***(VON BLUMRODER et al., 2004).***

II.13.2.1.3. Test d'agglutination de *Neospora* (NAT)

Le Test d'agglutination de *Neospora (*NAT) est basé sur l'agglutination de tachyzoïtes entiers intacts de *N. caninum* en présence de sérums contenant des anticorps spécifiques. Il se caractérise par une simple exécution ***(PACKHAM et al., 1998, ROMAND et al., 1998).*** Cependant, dans une étude visant à comparant les ELISA, IFAT et NAT, ce dernier a montré une spécificité significativement plus faible (66,0 %) par rapport aux autres tests ***(WAPENAAR et al., 2007a).***

II.13.2.1.4. Western blot

La technique de Western blot a été utilisée pour l'identification des antigènes immunodominants des tachyzoïtes dans le sérum de l'hôte ***(ALVAREZ-GARCIA et al., 2002).*** Elle est généralement considérée comme une méthode fiable pour détecter les anticorps spécifiques de *N. caninum* chez les bovins ***(SINNOTT et al., 2017).*** En raison des longs temps d'exécution, la technique n'est pas adaptée au dépistage de gros nombre d'échantillons mais elle est utile comme méthode de confirmation lorsque des résultats incertains sont obtenus avec différents tests sérologiques ***(AGUADO-MARTINEZ et al., 2005).*** L'analyse WB est souvent recommandée pour retester des échantillons dans lesquels des niveaux limites de la fluorescence rend l'interprétation de l'IFAT difficile ***(GHALMI et al., 2014).***

II.13.2.1.5. Test immunochromatographique

Le test d'immunochromatographique rapide utilise un antigène recombinant qui est le NcSAG1 et qui est produit dans *E. coli* ***(LIAO et al., 2005).*** Ce test bien qu'il soit développé, il n'est toutefois pas été commercialisé. Le développement futur de dispositifs utilisant les antigènes de *N.caninum* pour la détection d'anticorps spécifiques dans le sang total, le plasma, le sérum ou le lait peut représenter une option possible pour augmenter la rapidité et l'applicabilité aux conditions de terrain des outils de diagnostic de la néosporose bovine.

II.13.2.1.6. Antigènes recombinants pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose chez différentes espèces animales et la néosporose chez les bovins

Les tests sérologiques pour le diagnostic de la toxoplasmose emploient généralement une préparation d'antigènes de lysat (TLA) entiers de *T. gondii* ***(HOLEC-GASIOR , 2014)***. Cependant, comme pour le diagnostic de la néosporose bovine, l'utilisation d'antigènes recombinants a été largement enquêtée. Les antigènes de *T. gondii* utilisés pour le diagnostic de la toxoplasmose chez les espèces animales comprennent les antigènes de surface recombinants (TgSAG1, TgSAG2), les protéines à granules denses (TgGRA1, TgGRA2, TgGRA6, TgGRA7, TgGRA15), la protéine micronème 1 (TgMIC1), la protéines rhoptrie 1 (TgROP1) ainsi que l'antigène matriciel 1 (TgMAG1) ***(FERRA et al., 2015).*** Appliqués seuls ou en combinaison, ces antigènes recombinants ont été utilisés principalement pour le développement des ELISA, ainsi que des tests d'agglutination au latex (LAT), comme outils pour la détection de l'infection à *T. gondii* chez le bétail (moutons, porcs et chevaux) ***(FERRA et al., 2015).*** Les antigènes recombinants pour le sérodiagnostic de *N. caninum* chez les bovins comprennent NcSAG1 ***(CHAHAN et al., 2003***, ***HOWE et al., 2002),*** NcSRS2 ***(ANDREOTTI et al., 2009***, ***BORSUK et al., 2011***, ***LIU et al., 2007),*** NcGRA6 ***(GHALMI et al., 2014)*** et NcGRA7 ***(JENKINS et al., 1997, HUANG et al., 2007, AGUADO-MARTINEZ et al., 2008***). Les antigènes spécifiques des bradyzoïtes ont également été décrits, dont NcSAG4 (***FERNANDEZ-GARCIA et al., 2006),*** NcBRS4 et NcSRS9 ***(RISCO-CASTILLO et al., 2011).***

II.13.2.1.7. Serologie pré-colostrale

La détection des anticorps spécifiques à *N. caninum* dans le sérum pré-colostral des veaux nouveaux-nés peuvent être utilisés pour enquêter sur la voie de la transmission et d'évaluer indirectement le statut d'infection ***(DUBEY et al., 2007, HIETALA ET THURMOND 1999).*** Chez les bovins et autres ruminants, la placentation syndesmochoriale ne permet pas le passage transplacentaire des anticorps, et le veau naît agammaglobulinémique ***(LEVIEUX, 1984) ; KOTERBA et HOUSE, 1996)*** et doit impérativement acquérir une immunité passive par l'intermédiaire du colostrum produit par la mère. Par conséquent, la présence d'anticorps spécifiques chez les veaux pré-colostraux indiquent l'activité du système immunitaire fœtal suite à l'exposition à l'agent pathogène à *utero* ***(INNES, 2007).*** Néanmoins, l'absence d'anticorps spécifiques chez les veaux nouveaux-nés avant la prise du colustrum ou chez les veaux morts-nés, suggère que l'infection par *N. caninum* soit improbable ; bien que l'absence d'infection ne soit pas concluante ***(DUBEY et SCHARES, 2006)***, en effet, le développement des anticorps spécifiques dépend du moment de l'infection in utéro

(ANDERSON et al., 1997). Les veaux infectés tardivement au cours de la gestation n'ont peut-être pas eu suffisamment de temps pour se séroconvertir avant la naissance ***(DUBEY et al., 2007***). Compte tenu de la difficulté d'obtenir des sérums pré-colostral dans la plupart des conditions de terrain, la sérologie est une option diagnostique peu pratique. Cependant, il peut être très informatif à des fins de recherche ***(GUIDO et al., 2016).***

II.13.2.1.8. Analyse du lait en vrac

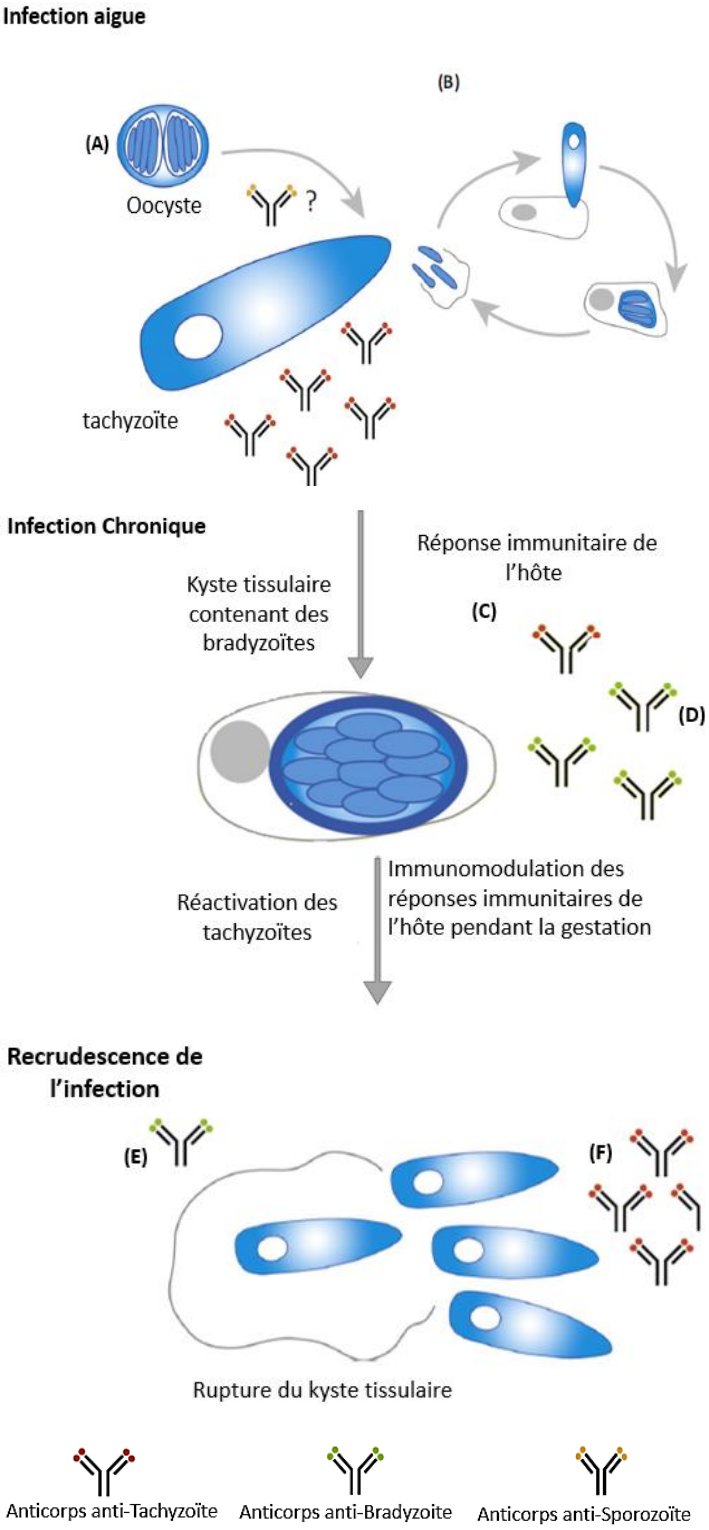
Dans les troupeaux laitiers, la détection d'anticorps spécifiques de *N. caninum* dans le lait en vrac est utile. Elle permet l'estimation de la séroprévalence d'un groupe d'animaux qui contribuent à l'échantillon de lait ***(SCHARES et al., 2003).*** Il a été rapporté une bonne corrélation entre les résultats sérologiques du lait en vrac et la séroprévalence évaluée par le test d'échantillons individuels de sérum ou de plasma ***(BARTELS et al., 2005, MILNE et al., 2006, WAPENAAR et al., 2007a).*** L'interprétation des résultats des tests sur le lait en vrac nécessite des considérations spécifiques. Suivant l'exposition à un agent pathogène, les anticorps du lait apparaissent plus tard et à une concentration plus faible, environ 30 fois plus faible dans le lait que dans le sérum ***(BUTLER, 1983).*** Les niveaux d'anticorps dans le lait en vrac dépendent de la proportion d'animaux séropositifs; cependant, le stade de la lactation et la production laitière influencent également la concentration d'anticorps spécifiques ***(FROSSLING et al., 2006).*** Les ELISA couramment utilisés pour tester les sérums de bovins ont été adaptés pour être utilisés sur les échantillions de lait en vrac, cependant, la sensibilité rapportée est généralement limitée ***(SCHARES et al., 2004).*** Pour ce test un minimum de 10 à 15 % d'animaux séropositifs semble être nécessaire pour produire des résultats positifs ***(BARTELS et al., 2005, FROSSLING et al., 2006, WAPENAAR et al., 2007a).*** Par conséquent, la méthode peut sous-estimer la proportion des troupeaux infectés dans lesquels la séroprévalence de *N. caninum* est faible. Néanmoins, le diagnostic sérologique de *N. caninum* lait en vrac est considéré comme une option diagnostique rentable et non invasive qui peut fournir une indication préliminaire utile du statut sérologique dans les troupeaux laitiers.

II.13.2.1.9. Limites actuelles des diagnostics sérologiques

Les vaches infectées par *N. caninum* peuvent échapper aux tests sérologiques actuellement disponibles en raison des variations des titres d'anticorps observés tout au long de l'infection. les rapports des mères sérologiquement négatives à *N. caninum* donnant naissance à des veaux séropositifs ou des avortons dans lesquels l'ADN du parasite a été détecté ***(SAGER et al., 2001 ; MAZUZ et al., 2014)*** ainsi que des preuves post-mortem de l'infection à *N. caninum* trouvée dans les tissus de vaches séronégatives n'ayant pas avorté ***(BENAVIDES et***

al., 2012). Chez les bovins, les fluctuations des titres d'anticorps spécifiques de *N. caninum* sont bien documentées ***(GUY et al., 2001, JENKINS et al., 2002, WALDNER et al., 1998).*** Ceux-ci peuvent se produire en fonction de l'état physiologique de la mère et de l'activité du parasite qui dépend de la réponse immunitaire de l'hôte ***(INNES, 2007).*** Dans certains cas, les taux d'anticorps peuvent chuter en dessous des limites de détection des tests sérologiques de sorte que les tests sérologiques des animaux positifs peuvent devenir séronégatifs. Une étude sérologique prospective chez les bovins laitiers a révélé que plus d'un tiers des vaches, avec de faibles titres d'anticorps (1:200) pendant la gestation, sont devenues sérologiquement négatives à la fin de la gestation ***(MAZUZ et al., 2014)***. De plus, deux études menées en Argentine ont rapporté que 5 % (***PARE et al., 1996 , MORE et al., 2009)*** et 3 % ***(MORE et al., 2009)*** des mères séronégatives au vêlage ont donné naissance à des veaux séropositifs. La plupart des travaux rapportent des fluctuations dans les concentrations d'anticorps spécifiques de *N. caninum* chez les bovins et se réfèrent aux réponses humorales qui reconnaissent le stade tachyzoïte du parasite car ceux-ci sont ciblés par la grande majorité des tests diagnostiques. Des préoccupations concernant la sensibilité des tests basés uniquement sur les antigènes de tachyzoïte ont été élevés suite à une observation intéressante d'une vache dont la réponse en anticorps était capable de reconnaître les antigènes spécifiques aux bradyzoïtes mais pas aux tachyzoïtes ***(BENAVIDES et al., 2012).*** Cette vache a été maintenue dans des conditions expérimentales comme un contrôle négatif pour une expérience d'infection à *N. caninum* . Elle a été testée négative à plusieurs reprises avec des ELISA commerciaux et expérimentaux basés sur les tachyzoïtes ; cependant, l'ADN du parasite a été détecté dans plusieurs tissus en post-mortem, et d'autres analyses sérologiques ont été effectuées avec un ELISA basé sur l'antigène spécifique du bradyzoïte (SAG4) a mis en évidence une séropositivité aux antigènes de bradyzoïte quiescent de *N. caninum*. Chez les animaux infectés expérimentalement, les réponses humorales à *N. caninum* spécifiques aux antigènes des bradyzoïtes présentent une variabilité individuelle ***(AGUADO-MARTINEZ et al., 2008).*** En effet, chez les bovins les réponses en anticorps contre les antigènes bradyzoïtes dépendront de l'intensité et de la durée d'exposition à un antigène spécifique au cours de l'interaction hôte-parasite. En plus, la rupture des kystes tissulaires peut également être nécessaire pour une réponse immunitaire detectable contre les antigènes du bradyzoïte. Comme suggéré pour certains antigènes des bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, les antigènes spécifiques du stade quiescent peuvent difficilement être exposés ***(GROSS et al., 2004).*** Compte tenu des limites des tests diagnostiques actuels, il a été difficile d'évaluer l'impact épidémiologique des animaux qui sont constamment infectés par *N. caninum* mais sérologiquement négatifs. Le

développement de des tests de diagnostic améliorés peuvent aider à l'identification correcte de ces animaux, et faciliter ainsi les estimations de la fréquence de l'infection persistante **(Figure 9).**



(A) L'ingestion d'oocystes sporulés avec libération de sporozoïtes peut exposer le système immunitaire de l' hôte aux antigènes spécifiques des sporozoïtes; Il y a peu d'informations sur les réponses d'anticorps spécifiques à la sporozoïte au cours de la première étape suivant l'infection par l'oocyste. Une fois les sporozoïtes infectent les cellules ils se convertissent en tachyzoïtes.

(B) les tachyzoïtes se multiplient rapidement par de endodyogenie à l'intérieur de plusieurs types de cellules qui se rompent ensuite, déclenchant le développement de réponses d'anticorps spécifiques à la tachyzoïte. Ces anticorps se trouvent chez la plupart des animaux infectés et sont détectées par des outils de diagnostic actuels basés sur les antigènes de tachyzoïte.

(C) Les tachyzoïtes se convertissent en bradyzoïte / stade de kyste tissulaire, des anticorps spécifiques à la bradyzoïte sont produits; Cependant, la quantité et la durée de cette réponse est inconnue.

(D) lors de la conversion des bradyzoïtes/ kyste tissulaire, les réponses d'anticorps spécifiques à la tachyzoïde peuvent diminuer sous les seuils des tests de diagnostic actuels. Cela peut entraîner de faux résultats négatifs.

(E) L'immunomodulation pendant la gestation peut permettre une réactivation des bradyzoïtes en tachyzoïtes qui se propagent dans tout le corps, stimulant ainsi les réponses immunitaires spécifiques à la tachyzoïde.

(F) Anticorps contre les bradyzoites / kystes tissulaires peut décliner à ce stade, bien qu'il y ait peu d'informations sur la dynamique de ces réponses humorales spécifiques à l'infection parce que les tests de diagnostic ciblant les réponses humoral spécifiques au bradyzoïte ne sont pas utilisées actuellement.

Figure 9 : Réponses hypothetiques des anticoprs aprés infection par *N. caninum* ***(Guido et al. 2016)***

II.14. Seroprevalence de l'infection à *Neospora caninum* chez les bovins

Des études ont été effectuées dans de nombreux pays pour identifier l'infection par *N. caninum* ***(Tableau 2).*** La séroprévalence individuelle de l'infection a varié dans les six dernières années de 3,4% ***(AYINMODE et al. 2017)*** à 41,2% ***(QIAN et al. 2017)*** et la séroprévalence du troupeau peut atteindre 100% ***(RAZMI et al. 2006).*** La séroprévalence de l'infection par *N. caninum* chez l'espèce bovine varie en fonction du pays, de la région, du test sérologique employé, de l'existence ou non d'un avortement chez l'animal examiné et du seuil de détection des tests utilisés. La séroprévalence chez les bovins a été analysée chez le veau, la vache, et au sein des cheptels laitiers ou viandeux.

Tableau 2 : Séroprévalence des anticorps anti-*N. caninum* depuis 2016.

Région	Pays	Methode de diagnostic	N°	Prévalence (%)	Auteurs
Afrique	Algérie	ELISA	360	54 (15)	***DERDOUR et al. (2017)***
	Egypte	ELISA	301	57 (18,9)	***FEREIG et al. (2016)***
	Maroc	ELISA	176	15 (8,52)	***LUCCHESE et al. (2016)***
	Nigéria	ELISA	174	6 (3,4)	***AYINMODE et al. (2017)***
Amérique	Mexique	ELISA	184	22 (11,9)	***RABAGO et al. (2017)***
	Brazil	IFAT	1273	305 (24)	***PESSOA et al. (2016)***
	Brazil	IFAT	1518	466 (30,69)	***FAVERO et al. (2017)***
	Brazil	ELISA	119	41 (34,45)	***SANTIN et al. (2017)***
	Brazil	IFAT	600	142 (23,67)	***SNAK et al. (2018)***
	Brazil	ELISA	322	100 (31,1)	***GINDRI et al. (2018)***
	Chile	ELISA	437	92 (21,1)	***TUEMMERS et al. (2017)***
Asie	Chine	ELISA	510	210 (41,2)	***QIAN et al. (2017)***
	Indonesia	ELISA	991	165 (16,64)	***ICHIKAWA et al. (2016)***
	Iran	ELISA	1500	395 (26,33)	***HOSSEININEJAD et al.(2017)***
	Turkey	ELISA	116	21 (18,1)	***YILDIZ et al. (2017)***
Europe	Poland	ELISA	734	143 (19,5)	***KOWALCZYK et al. (2016)***
	Slovakia	ELISA	490	118 (24,1)	***ŠPILOVSKA et al. (2015)***
Océanie	Australia	ELISA	3298	169 (5,12)	***MOLONEY et al. (2017)***

Au niveau des différentes matrices, on constate que dans le lait la séroprévalence varie de 7,9 % à 76 % alors que l'analyse du sérum bovin montre une variation de 4,1 % à 71% ***(GHALMI et al., 2007).*** Bien que, la majorité des études sur la prévalence de *N. caninum* chez le bovin ait été réalisée par des techniques sérologiques, la PCR appliquée chez les avortons bovins est aussi utilisée. Une étude en Espagne a montré que 75 % des avortons étaient positifs au test PCR en temps réel et 83 % en PCR nichée ***(COLLANTES-FERNANDES et al., 2002)***. En Corée, la présence de *N. caninum* a aussi été confirmée par PCR et IHC chez 25 % d'avortons ***(KIM et al., 2002).*** De même, lors d'une autre etude suisse, *N. caninum* a été mis en évidence chez 16,1 % des avortons bovins par PCR en temps réel ***(REITT et al., 2007).*** Au Brésil, une étude similaire a permis de mettre en évidence *N. caninum* par PCR chez 31,25 %

des avortons ***(PAULA et al., 2004).*** *N. caninum* a aussi été mis en évidence par PCR à partir de sperme et du sang de taureaux ***(ORTEGA- MORA et al., 2003 ; CAETANO-DA-SILVA et al., 2004 ; FERRE et al., 2005),*** même si les signaux sont souvent tres faibles et que l'excretion est inconstante dans le temps. Dans les différentes régions de l'Algérie, plusieurs études ont été effectuées pour évaluer la séroprévalence de l'infection par *N.caninum* parmi les bovins laitiers. En Algérie, la séroprévalence individuelle de l'infection à *N. caninum* varie de 12.22% à 30,30% ***(Tableau 3).***

Tableau 3 : Séroprévalence des anticorps anti-N. *caninum* En Algérie

Régions	**Methode de diagnostic**	**Nombre**	**Prevalence (%)**	**Auteurs**
Guelma et Tebessa	ELISA	90	11(12.22)	***MIROUD et al , 2019***
Alger	ELISA	306	54(15.00)	***DERDOUR et al ,2017***
Constantine	ELISA	145	23(16.00)	***BOUAZIZ et al 2013***
Alger, Bejaia et Setif	IFAT	799	157(19.60)	***GHALMI et al, 2011***
Blida et Tipaza	ELISA	66	21(30.30)	***DECHICHA et al, 2010***
Ain Defla Alger, Blida, Tipaza et Medea	IFAT	186	23(12.37)	***ACHOUR et al, 2012***

II.15. Facteurs de risque à une infection par *N. caninum*

Il existe un certain nombre d'études sur les facteurs de risque de l'infection évaluant le risque individuel ou de troupeaux bovins infectés par *N. caninum* ou subissant des avortements associés au parasite.

II.15.1. Âge

Le risque d'être séropositif peut augmenter avec l'âge ou le nombre de gestation chez les bovins de boucherie et laitiers ***(DYER et al., 2000 ; JENSEN et al., 1999, OSAWA et al., 2002, SANDERSON et al., 2000). WALDNER et al. (1998)*** ont rapporté un effet négatif de l'âge sur la prévalence des bovins laitiers au Canada. Dans une étude européenne récente, il a été observé que l'effet de l'âge sur la séropositivité chez les bovins laitiers peut varier selon les zones d'étude. En Espagne, par exemple, le risque d'être séropositif augmentait avec l'âge, alors qu'en Suède la situation était le contraire ***(FROSSLING et al. 2006).*** On peut supposer que ces differences viennent de la probabilite d'ingerer ou non des oocystes ou encore de la façon de gérer les troupeaux. Si le taux de remplacement est important, le risque d'exposition est faible ***(DUBEY et al., 2007).***

II.15.2. Hôte definitif

Dans la plupart des études épidemiologiques actuelles ou plus anciennes sur des troupeaux laitiers , la presence des chiens de ferme ou le nombre de chiens présents était considéré

comme un facteur de risque d'avoir des bovins seropositifs ***(PARE et al., 1998 ; MAINAR-JAIME et al., 1999 ; SCHARES et al., 2004 ; VON BLUMRÖDER et al., 2004 ; CORBELLINI et al., 2006).*** ***WOUDA et collaborateurs (1999)*** ont montré que la séropositivité chez les chiens de ferme était corrélée avec la séropositivité chez les bovins puisque le chien est l'hote definitif, source d'oocystes (***MCALLISTER et al., 1998*** ; ***BASSO et al., 2001).*** La défécation des chiens sur la nourriture destinée aux bovins est rapportée plus souvent dans les fermes avec des problèmes d'avortement ***(DIJKSTRA et al., 2002).*** Les avortons et les placentas sont des sources possibles d'infection pour les chiens. Dans les élevages présentant des problemes d'avortement le plus souvent, les chiens se nourrissaient de placentas bovins, de colostrum ou de lait ***(DIJKSTRA et al., 2002).*** Cependant, les tachyzoïtes ne résistent pas longtemps dans les avortons ***(CONRAD et al., 1993a).*** Il semble egalement que l'introduction de nouveaux chiens pose plus de problemes de risque de transmission de *N. caninum* que les chiens résidents ***(DIJKSTRA et al., 2002).*** Selon certains auteurs, l'excretion d'oocystes par le chien diminue si on nourrit le chien de façon repetée avec du materiel infecté ***(DIJKSTRA et al., 2001; SCHARES et al., 2001 ; GONDIM et al., 2005).*** De plus, il a été constaté que des quantites plus importantes d'oocystes sont excretees par les jeunes chiens ***(GONDIM et al., 2005).*** En outre, les chiens du voisinage sont aussi un problème puisque la densité des chiens est un facteur prédictif de la séropositivité des troupeaux ***(SCHARES et al., 2004)***.

II.15.3. Hôtes intermédiaires autres que les bovins.

D'autres hôtes intermédiaires de *N. caninum* peuvent être une source d'infection pour les chiens et les autres canidés. La présence d'ADN de *N. caninum* chez les souris et les rats naturellement infectés suggère que ces animaux peuvent être des sources importantes d'infection pour les carnivores hôtes définitifs de *N. caninum*. Des chercheurs français ont signalé que la présence de lapins et/ou de canards pouvait être un facteur de risque de séropositivité chez les bovins laitiers ***(OULD-AMROUCHE et al., 1999).*** Dans une étude au nord de l'Italie, le risque de séropositivité chez les bovins augmentait lorsque les volailles étaient présents dans l'exploitation ***(OTRANTO et al., 2003). BARTELS et al. 1999*** ont également trouvé que la présence de volailles dans l'exploitation était un facteur de risque d'avortement associé à *N. caninum*. Ces résultats justifient la sensibilité des lapins, des canards et des volailles à *N. caninum* et ces hôtes intermédiaires potentiels présentent un risque d'infection pour les hôtes définitifs ***(DUBEY et al., 2007).***

II.15.4. Paturâge, fourrage et eau potable

La contamination des pâturages, des fourrages et de l'eau potable par les oocystes de *N. caninum* est considéré comme sources d'infection postnatale du bétail. Par conséquent, il est important de savoir quelles pratiques d'alimentation entraînent une augmentation de risque d'infection. Le pâturage des animaux en plein air durant la bonne saison semble être un facteur protecteur ***(SANDERSON et al., 2000 ; OTRANTO et al., 2003).*** Bien que les canidés et les chiens sauvages aient accès libre aux pâturages, la contamination par les oocystes éliminés par les hôtes définitifs peut être trop faible pour poser des oocystes qui peuvent ne pas survivre pendant les mois d'été s'ils sont très chauds et secs. Malheureusement, les informations sur les conditions climatiques sous lesquelles les oocystes de *N. caninum* sont capables de survivre dans l'environnement est rare ***(DUBEY et al., 2007).*** Dans les troupeaux de bovins de boucherie, l'utilisation du distrbuteur de foin semblait être un facteur de risque de séropositivité (***BARLING et al., 2001)***. Ce facteur s'expliquait par le fait que les vaches vêlent, avortent ou expulsent souvent les placentas a proximité des distributeurs de foin. Comme ces distributeurs de foin sont rarement déplacés ou lavés, ils sont fréquemment souillés par des matières fécales de chiens contaminés ***(BARLING et al., 2001).*** Dans une étude menée en France, l'utilisation d'étangs plutôt que l'utilisation d'un puits ou d'un réseau public d'approvisionnement en eau potable s'est avéré être un facteur de risque d'infection à *N. caninum* chez les bovins laitiers ***(OULD-AMROUCHE et al. 1999)***. Les données de séroprévalence des mammifères marins sauvages suggèrent que les oocystes de *N. caninum* peuvent contaminer les eaux de surface et ensuite contaminer l'eau de mer ***(OSSAWA et al. 2002 ; DUBEY et al., 2003).***

II.15.5. Lait et colostrum

Des études expérimentales ont montré que les veaux nouveaux-nés pouvaient être infectés par l'ingestion de lait contenant des tachyzoïtes ***(UGGLA et al., 1998 ; DAVISON et al., 2001).*** Depuis, la découverte de *N. caninum* dans le lait de vache ***(MOSKWA et al., 2003 ; 2007),*** un débat a eu lieu sur la question de savoir si la transmission lactogénique de *N. caninum* est possible. Par rapport à cela, l'utilisation du colostrum regroupé est un facteur de risque de séropositivité ***(CORBELLINI et al., 2006).***

II.15.6. Saison

Dans une analyse des facteurs de risque au Texas, l'effet saisonnier des vêlages au printemps était important ; c'est-à-dire que le risque pour les veaux d'être séropositifs durant le printemps était supérieur à ceux nés à en automne ***(BARLING et al., 2001).*** Il y' aurait un effet saison chez ces troupeaux à viande sur le risque de donner des veaux infectés, soit par voie

transplacentaire, soit par voie horizontale (postnatale). Cette saisonnalité peut être biologiquement liée à la saison de mise bas des hôtes définitifs au Texas (coyotes et renards gris).

II.15.7. Densité

Une densité importante de bovins a été identifiée comme un facteur de risque ***(BARLING et al., 2000 ; SANDERSON et al., 2000 ; BARLING et al., 2001***). Les fermes utilisent la nourriture supplémentaire qui est stockée dans des silos qui sont régulièrement visités par des rongeurs considérés comme proies pour les hôtes définitifs ***(DUBEY et al., 2007).***

II.15.8. Taille du troupeau.

En Italie, le risque individuel de devenir séropositif augmente avec la taille du troupeau. Le nombre de chiens par ferme interagi de manière significative avec la taille de troupeau; C'est-à-dire que le risque d'être séropositif est lié au nombre plus important de chiens dans les fermes de grande taille ***(OTRANTO et al.,2003)***. Dans une étude menée en Allemagne, des troupeaux plus grands avaient un risque accru d' avoir du lait positif ***(SCHARES et al., 2004***). Plus la taille de troupeau est importante, plus les mesures d'hygiène pour prévenir les chiens de se nourrir de placentas ou d'autres matériaux infectieux sont difficiles ***(DUBEY et al., 2007).***

II.15.9. Source de génisses de remplacement

La transmission verticale de *N. caninum* est très efficace. L'élevage de génisses de remplacement à la ferme plutôt que de les acquirir à l'extérieur appuient l'affirmation selon laquelle une prévalence existante dans un troupeau peut persister pendant de nombreuses années ***(STENLUND et al., 2003 ; FRÖSSLING et al., 2005).*** Si la séroprévalence est plus élevée dans le troupeau receveur que dans la population d'où proviennent les génisses de remplacement, l'achat des génisses de remplacement devrait réduire l'infection dans le troupeau receveur. Cela pourrait expliquer pourquoi l'élevage de ses propres génisses de remplacement a été identifié comme un facteur de risque potentiel pour une séroprévalence élevée chez le veau ***(BARLING et al., 2001).***

II.15.10. Climat

Des études européennes mettent en évidence l'effet du climat sur la séropositivitée individuelle et du troupeau ***(SCHARES et al., 2004 ; RINALDI et al., 2005).*** Ceci peut s'expliquer par le rôle du climat sur la sporulation et la survie des oocystes. Par exemple, une grande température peut favoriser une sporulation plus rapide des oocystes dans le fourrage ou dans l'environnement immediat des bovins ***(DUBEY et al., 2007)***.

II.16. Contrôle de la néosporose bovine

Les programmes de contrôle de la néosporose bovine ont comme objectifs clés la minimisation des pertes reproductrices et la réduction de la prévalence de l'infection au niveau des troupeaux. Les stratégies de contrôle actuelles reposent sur des techniques de gestion visant à interrompre le cycle de vie de *N. caninum* à un ou plusieurs stades ***(MCALLISTER, 2016).*** Il s'agit de la mise en œuvre de plans de contrôle efficace en intégrant des mesures pour empêcher la transmission horizontale de l'hôte canidé et des méthodes pour réduire les risques de transmission verticale de la mère au fœtus dans les troupeaux infectés ***(FROSSLING et al., 2005).*** Compte tenu des différentes options de contrôle disponibles, une évaluation précise de l'impact de la maladie au niveau du troupeau et une analyse coûts-avantages approfondie sont nécessaires avant se lancer dans des efforts de contrôle de la maladie ***(REICHEL et al., 2014).*** Les coûts de la néosporose bovine englobe la perte de revenus des veaux des vaches avortées, la diminution de la production du lait en raison d'intervalles de vêlage prolongés, des coûts de reproduction ou, éventuellement, de remplacement des vaches qui avortent et les dépenses associées à l'enquête sur les cas l'avortement. De plus, les troupeaux infectés peuvent être soumis à une réduction globale de la valeur reproducteur du cheptel ***(REICHEL et al., 2013).***

II.16.1. Prévention de l'infection horizontale

Les mesures visant à minimiser la contamination des aliments pour animaux, de l'eau et des zones d'élevage par les oocystes de *N. caninum* sont essentiels pour prévenir la transmission postnatale à partir des canidés infectés. La plupart des études épidémiologiques s'accordent pour dire que la présence de chiens dans les locaux de bovins reproducteurs représentent un facteur de risque de néosporose bovine. Autrement dit, le nombre de chiens à la ferme doit être limité et l'accès des canidés errants doit être contrôlé. Dans les troupeaux infectés, les chiens de ferme adultes sont probablement déjà été infectés par *N. caninum* et sont par conséquent moins susceptible d'excréter des oocystes ***(ANTONY ET WILLIAMSON, 2003).*** Cependant, les chiots qui sont susceptibles d'être naïfs du parasite, sont considérés comme un risque plus élevé de produire des oocystes après une infection. Les matières fécales des chiots peuvent avoir accès aux zones de stockage du bétail et des aliments pour animaux . La protection des zones de stockage des aliments et d'équipement de mélange d'aliments est fortement recommandée contre les contaminations fécales les chiens. De même, la protection des sources de l'eau potable en utilisant des abreuvoirs surélevés avec de l'eau potable peut aider à prévenir le bétail a l'exposition aux oocystes de *N. caninum* ***(MCALLISTER, 2016).***

Étant donné que les chiens peuvent contracter l'infection en ingérant des tissus bovins infectés, l'élimination rapide des avortons ainsi que des veaux mort-nés est importante pour arrêter le cycle de vie du parasite ***(BASSO et al., 2001, DIJKSTRA et al., 2001a).*** De plus, les chiens ne doivent pas être nourris avec des tissus de ruminants crus, car ils peuvent contenir des kystes tissulaires de *N. caninum* ***(CAVALCANTE et al., 2011).*** La détection de l'ADN de *N. caninum* dans les tissus de souris et de rats sauvages a suggéré que ces espèces peuvent jouer le rôle d'hôtes intermédiaires pour le parasite. Bien qu'il n'y ait pas de preuves définitives, les rongeurs peuvent représenter une source d'infection pour les canidés domestiques et sauvages et jouer un rôle dans le maintien et la propagation de la néosporose ***(FERROGLIO et al., 2007, JENKINS et al., 2007).*** Par conséquent, le contrôle des rongeurs à la ferme serait également recommandé. Cela réduirait également le risque de la leptospirose, produisant ainsi des avantages supplémentaires dans le contrôle des pertes de reproduction chez les bovins en général ***(REICHEL et al., 2013).*** De même, un rôle potentiel des volailles de plein air dans l'épidémiologie de *N. caninum* a été suggéré. La présence de poulets, qui peuvent être infectés par le parasite ***(COSTA et al., 2008),*** était corrélée à un risque accru d'avortement bovin ***(BARTELS et al., 1999)*** et une augmentation de la séroprévalence chez les bovins ***(OTRANTO et al., 2003).***

II.16.2. Gestion de la transmission verticale

Les tests sérologiques associés à une gestion adéquate des animaux positifs sont les méthodes les plus courantes pour limiter la transmission endogène au sein d'un troupeau ***(GUIDO et al., 2016).*** Les vaches infectées peuvent être retirées du troupeau (réforme) ou exclues pour générer les femelles de remplacement de l'élevage ***(REICHEL et al., 2014***).

L'identification fiable de tous les animaux infectés par *N. caninum* nécessite des tests sérologiques dans lesquels les seuils de détection sont ajustés pour fournir un niveau maximal de sensibilité ***(REICHEL ET ELLIS, 2002).*** Cependant, la possibilité de faux résultats négatifs peuvant affecter l'efficacité des mesures de lutte contre la maladie.

II.16.2.1. Tester et abattre

Il a été démontré que l'abattage des mères séropositives pour *N. caninum* réduisait la prévalence au fil du temps dans les exploitations où des mesures adéquates de prévention de l'infection étaient en place ***(FROSSLING et al., 2005, HALL et al., 2005).*** Certains auteurs se sont demandés si la rétention d'animaux infectés serait plus bénéfique que de viser un troupeau dans lequel tous les animaux sont complètement naïfs à l'agent pathogène donc plus sensibles aux infections horizontales ***(INNES et al., 2000, MCALLISTER et al., 2000).*** Cette préoccupation est née de l'observation qui rapporte que les bovins peuvent développer une

immunité partielle contre le parasite et que le risque d'avortement a tendance à diminuer avec le temps chez les vaches exposées à plusieurs reprises au parasite ***(INNES et al., 2000).*** Bien qu'une exposition environnementale répétée à *N. caninum* peut éventuellement conduire à un risque plus faible d'avortement, il est prouvé que ce risque est encore plus élevé que chez les animaux séronégatifs ***(REICHEL et al., 2013).*** En plus , ces mères sont toujours capables de transmettre le parasite à leur progéniture et de maintenir ainsi l'infection dans le troupeau et reporter le risque d'avortement aux prochaines générations ***(REICHEL et al., 2013).*** En raison des coûts élevés impliqués, l'abattage des animaux séropositifs peut être économiquement durable uniquement dans les troupeaux avec une faible séroprévalence dans laquelle seule une petite proportion d'animaux devraient etre enlevés.

II.16.2.2. Élevage sélectif

L'exclusion des génisses nées de mères seropositives de la reproduction réduit le risque d'infections in utero au niveau du troupeau ***(FROSSLING et al., 2005).*** Ce contrôle est efficace à condition que la transmission verticale endogène soit la voie prédominante d'infection et la transmission exogène postnatale est négligeable ***(HALL et al., 2005, LANDMANN et al., 2011).*** Dans les fermes avec une séroprévalence élevée de *N. caninum* (≥50%), éviter le remplacement de l'élevage à partir du stock des mères séropositives s'est avéré économiquement durable ***(HASLER et al., 2008).*** Dans un modèle de simulation coût-bénéfice qui étudie les différentes options de contrôle dans les troupeaux de bovins infectés de manière endémique, le meilleur rendement économique a été fourni par l'exclusion des génisses de mères séropositives comme substituts potentiels ***(LARSON et al., 2004).*** L'Analyse sérologique de toutes les génisses potentielles de remplacement, quel que soit l'état de leurs mères, pourrait être effectuée pour augmenter le niveau de confiance que les femelles reproductrices potentielles n'hébergent pas *N. caninum*. La sérologie peut être faite avant l'ingestion du colostrum, mais elle est le plus souvent effectuée après l'âge de 6 mois lorsque les taux d'anticorps maternels, dus au transfert passif via le colostrum sont diminués ***(MCALLISTER, 2016).***

II.16.2.3. Tester les reproductrices de remplacement

Les vaches et génisses achetées représentent un risque d'introduction de *N. caninum* dans le troupeau. En règle générale, le cheptel reproducteur de remplacement devrait être obtenu à partir de troupeaux avec des performances d'élevage remarquables et aucun antécédent de néosporose bovine ***(ROELANDT et al., 2015).*** Les tests sérologiques doivent être effectués sur les animaux achetés de manière prospective. En raison de la possibilité de résultats faussement négatifs, certains auteurs recommandent de répéter les tests 4-6 semaines après

l'introduction dans le troupeau et re-tester les échantillons douteux par Western blot ***(ALVAREZ-GARCIA ET AL., 2003, ORTEGA-MORA ET AL., 2006).*** Le diagnostic sérologique des mères dont les génisses doivent être introduites dans le troupeau peut augmenter le risque d'identifier des individus de lignées infectées et testés faussement négatifs pour lesquels le parasite est transmis verticalement.

II.16.2.4. Gestion de la reproduction

Le transfert d'embryons (TE) de donneurs séropositifs à des receveurs séronégatifs peut empêcher la transmission endogène de *N. caninum* ***(LANDMANN et al., 2002 ,CAMPERO et al., 2003)*** dans les stades préimplantatoires. En effet, la zone pellucide protège les embryons du parasite ***(BIELANSKI et al., 2002).*** En outre, il existe plusieurs rapports de réussite de transfet d'embryons non infectés prélevés sur des mères infectées qui stopperait le cycle du parasite ***(BAILLARGEON et al., 2001, LANDMANN et al., 2002, CAMPERO et al., 2003).*** Les facteurs limitatifs de l'utilisation de la TE sont les coûts élevés qui ne peuvent être justifiés que par la haute valeur génétique du futur veau dans les troupeaux bovins. Une réduction significative du risque d'avortement a été observée chez les vaches laitières avec un haut rendement, séropositives à *N. caninum et* inséminées avec de la semence de taureaux de boucherie ***(LOPEZ-GATIUS et al., 2005).*** Ceci a été attribué à l'effet favorable du croisement sur la santé fœtale et la fonction placentaire ***(ALMERIA et al., 2009, LOPEZ-GATIUS et al., 2005).*** Même si elle est inefficace pour prévenir la transmission *in utero*, cette stratégie de prise en charge, garantit que les remplacements des bovins de reproduction infectés sont supprimés parce que les croisements entre les femelles laitières × viandeuses ne sont généralement pas conservées pour la production de lait.

II.16.2.5. Réduction des facteurs prédisposants

Étant donné le rôle des réponses immunitaires de l'hôte dans le contrôle et la réactivation de *N. caninum*, les infections concomitantes, les facteurs de gestion et d'autres facteurs de stress, qui peuvent provoquer une immunosuppression, peuvent être impliqués dans la réactivation des bradyzoïtes en tachyzoïtes avec une transmission verticale ultérieure. Certains auteurs ont suggéré que les maladies infectieuses, telles que la rhinotrachéite bovine (IBR) et la diarrhée virale bovine (BVD), qui se caractérisent par une immunosuppression, peuvent conduire à une réactivation de *N. caninum* et par conséquent une infection fœtale chez les mères gravides ***(REICHEL et al., 2013)***. Bien que l'absence de BVD s'avére avoir un effet protecteur contre l'infection par *N. caninum* ***(VANLEEUWEN et al., 2010),*** dans plusieurs études, un risque accru d'avortement chez les vaches séropositives pour les deux agents pathogènes n'a pas été observé ***(BJORKMAN et al., 2000, MAINAR- JAIME et al., 2001, STAHL et al., 2006***).

Néanmoins, le contrôle des infections concomitantes reproductives peuvent aider à réduire l'impact de la néosporose au niveau du troupeau. Les effets immunosuppresseurs des mycotoxines peuvent également jouer un rôle dans la recrudescence d'une infection persistante à *N. caninum* ***(BARTELS et al., 1999, DUBEY et al., 2007)***. Par conséquent, fournir aux mères gravides une alimentation de bonne qualité et un fourrage correctement stockés sont recommandés ***(MCALLISTER, 2016).***

II.16.3. Autres approches

II.16.3.1. Option « vivre avec la maladie »

Dans les troupeaux où la prévalence de la néosporose est faible, les coûts liés au mesures de lutte peuvent dépasser les pertes économiques encourues par la maladie. Ainsi, une politique non interventionniste de « vivre avec la maladie » peut être préférable comme plan d'action dans certaines exploitations ***(REICHEL et al., 2013).*** Dans une étude basée sur une modélisation mathématique, **REICHEL ET ELLIS (2006)** ont indiqué une prévalence au sein du troupeau de 18 à 21 % comme seuil au-dessus duquel les avantages des programmes de diagnostic et d'abattage dépasserait largement les coûts impliqués en termes de tests sérologiques et d'achats de femelles de remplacement.

II.16.3.2. Vaccination

L'analyse économique a suggéré que la vaccination pourrait être la stratégie la plus efficace de lutte contre la néosporose chez les bovins ***(REICHEL et ELLIS, 2006)*** ; cependant, les vaccins enregistrés ne sont actuellement pas disponibles. Il y a quelques années, un vaccin à base de Tachyzoïtes de *N. caninum*, Bovilis Neoguard® (Intervet International B.V., Boxmeer, Pays-Bas), a été enregistré dans plusieurs pays mais retiré par la suite du marché en raison de sa faible efficacité (***WESTON et al., 2012***). Le développement d'un vaccin efficace est certainement l'un des principaux objectifs de la recherche sur la néosporose bovine et des moyens considérables sont investis dans l'étude des vaccins utilisant à la fois des modèles murins et ruminants (***HEMPHILL et al., 2016***, ***HORCAJO et al., 2016).*** Les vaccins vivants atténués ont montré des résultats prometteurs dans différentes études. L'inoculation intraveineuse et sous-cutanée des bovins avec des tachyzoïtes de la souche Nc-Nowra atténuée a protégé les vaches gravides contre la foetopathie en induisant des anticorps puissants et réponses cellulaires avec la production d'IFN-γ ***(WEBER et al., 2013, WILLIAMS et al., 2007).*** L'isolat Nc-Spain1 naturellement atténué, inoculé avant l'insémination artificielle, a produit une protection contre la mort fœtale chez 50 % des animaux soumis par la suite à une stimulation avec la souche Nc-1 au début (jour 70) de la gestation. De plus, des anticorps pré-colostraux significativement plus faibles ont été observés chez les veaux asymptomatiques

nés de mères vaccinées pendant la mi-gestation (jour 135) ***(ROJO-MONTEJO et al., 2013).*** Une autre étude a rapporté une incidence significativement plus faible d'avortement chez les vaches vaccinées à la mi-gestation avec un isolat vivant dénommé Ncls491 (16 %) par rapport au groupe non vacciné (26 %). Dans le même essai, aucune différence dans la séroprévalence chez les veaux pré-colostral n'a été observée entre les groupes vaccinés et non vaccinés ***(MAZUZ et al., 2015).*** Des vaccins sous-unitaires ont également été développés ; cependant, une efficacité limitée a été observée. Les bovins non gestants immunisés avec la protéine NcGRA7 recombinant associée à l'oligomannose des microsomes (M3-NcGRA7) ont montré une amélioration des réponses immunitaires humorales et cellulaires ainsi qu'une réduction de la charge parasitaire dans le cerveau après stimulation avec le tachyzoïte de *N. caninum* (souche Nc-1) ***(NISHIMURA et al., 2013b).*** Dans un étude réalisée chez des vaches gravides stimulées au 70e jour de gestation, l'immunisation avec NcSAG1, NcHSP20 et rNcGRA7 recombinants, incorporés dans les ISCOM a suscité une réponse immunitaire humorale marquée mais cette immunisation n'a pas réussi à empêcher la transmission verticale ***(HECKER et al., 2014).*** Dans les années à venir, les ressources génomiques et transcriptomiques joueraient un rôle primordial dans l'identification in silico d'une liste prioritaire de candidats vaccins qui pourraient être évalués expérimentalement ***(GOODSWEN et al., 2013).***

II.16.3.3. Traitement antiprotozoaire

Malgré l'évaluation de l'efficacité de plusieurs médicaments contre *N. caninum* à la fois *in vitro* et *in vivo* chez les animaux de laboratoire, il n'y a pas de composés antiprotozoaires autorisés pour une utilisation chez les bovins en cas de néosporose ***(MULLER et HEMPHILL, 2013).*** Le toltrazuril est efficace contre diverses coccidies et largement utilisé pour le traitement de la coccidiose chez les volailles et les bovins; cependant, une efficacité limitée a été observée contre *N. caninum in vivo* ***(HAERDI et al., 2006).*** L'artémisinine et ses dérivés, la pentamidine dicationique et les spiroindolones sont les médicaments prometteurs ***(HEMPHILL et al., 2016).*** Néanmoins, il semble peu probable que le traitement pharmacologique de l'infection de *N. caninum* chez les bovins soit rentable. La prévention des avortements due a *N. caninum* impliquerait des administrations des antiprotozoaires à long terme entraînant un risque accru de résidus inacceptables dans le lait ou la viande. De plus, la mise en place de délais d'attente représenterait un surcoût de production ***(DUBEY et al., 2007, DUBEY et al., 2017).***

Étude des avortements et des lésions fœtales induits par *Neospora caninum* chez la race bovine locale infectée naturellement

Etude pratique

Thèse de doctorat **ABDELTIF Besma**

I. Objectifs et stratégie

La néosporose est connue pour être la cause majeure d'avortement chez les bovins dans de nombreux pays à travers le monde y compris en Algérie. Ces avortements constituent un réel problème économique pour les éleveurs. Outre les pertes économiques engendrées par les mortalités embryonnaires et fœtales, la néosporose bovine est également responsable d'une baisse des capacités de reproduction des exploitations, de la baisse de la valeur marchande des animaux, d'une réduction de la production laitière ainsi que de l'augmentation du taux de réforme ***(HOAR, 1996).*** La situation épidémiologique de la néosporose bovine au Maghreb reste peu connue ; des prévalences de 19,6 % et 15% chez les bovins de la région du centre d'Algérie ont été rapportée par ***GHALMI et al. (2011)*** et par ***DERDOUR* et al. (2017)** respectivement**.** Notre sujet de recherche tourne autour de l'hypothèse qui précise que le bovin local pourrait résister naturellement non pas à l'infection par *N. caninum* mais à son effet abortif. Le présent travail a eu pour principal objectif la détermination de la séroprévalence du *N. caninum* dans le cheptel bovin laitier local de la région Nord Est Algérien par la méthode immuno-enzymatique (ELISA), avec l'étude de certains facteurs de risque de l'infection par *N. caninum* et de vérifier l'existence d'un lien causal entre la présence d'anticorps dirigés contre *N. caninum* et les avortements, à travers une étude de type cas-témoins. Une étude histo-pathologiques sur des fœtus bovins issus de vache séropositives a été réalisée afin de déterminer la présence ou non des lésions caractéristiques de *N. caninum* au niveau des organes cible.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Etude Séro-épidemiologique

II.1.1. Période et région d'étude

Notre étude a été réalisée de janvier 2017 à septembre 2019. Elle a été menée sur des vaches des fermes privées appartenant aux cinq wilayas : Jijel, Skikda, Souk-Ahras, Annaba et d'El-Tarf, situées à l'extrémité Nord-Est du pays ((Latitude : 36°53'N-36°16'N, longitude :5°46'E-9° 19'E), près de la frontière tunisienne et à environ 600 km à l'Est de la capitale Alger ***(Figure 10)***. L'élevage bovin de population locale dans ces fermes est de type extensif, sur des pâturages naturels. Le climat de la région est typiquement méditerranéen. L'été est chaud et sec el l'hiver est doux et humide. Cette étude a été réalisée dans cette région parce qu'elle contient plus de la moitié du cheptel bovin de race locale. Il est concentré dans les zones difficiles, en particulier les montagnes et forêts. Il vit dans un système extensif. Ce système fait partie intégrante de l'agriculture familiale et l'économie nationale ***(YAKHLEF, 1989).***

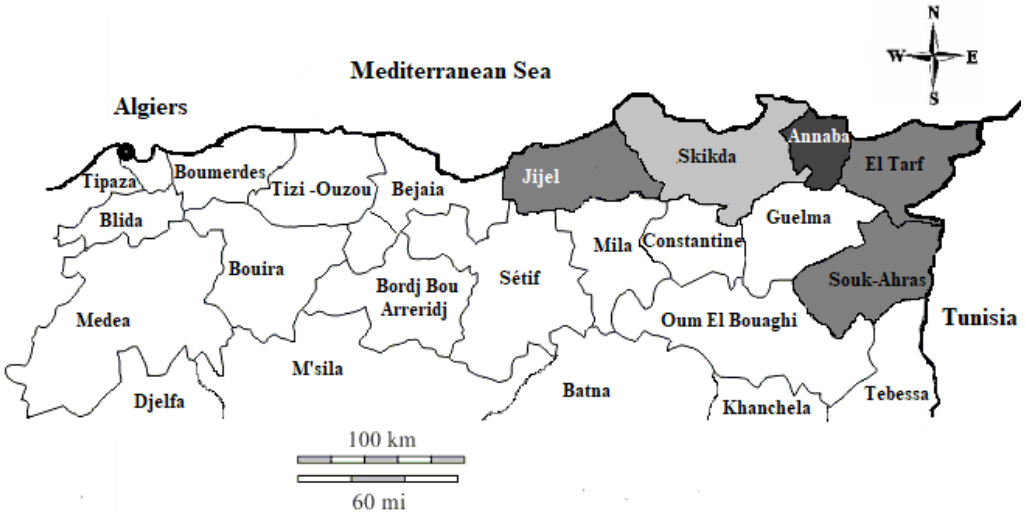


Figure 10 : Répartition géographique des fermes ayant fait l'objet de visite et de prélèvements sanguins (en couleur grise) (***ILLUSTRATION PERSONNELLE, 2022***).

II.1.2 Stratégie d'échantillonnage

II.1.2.1. Etudes cas témoins

Il est intéressant d'étudier l'impact global de ce parasite comme agent d'avortement chez la vache. Pour ce faire, on peut réaliser une étude cas-témoin ***(TOMA et al., 2001).*** Des vaches ayant avorté et des vaches n'ayant pas avorté sont sélectionnées ; on réalise ensuite une étude sérologique pour savoir si ces vaches sont séropositives ou non vis-à-vis de *N. caninum*. On obtient ainsi un tableau à deux entrées représentant les vaches avortantes (cas), les vaches non avortantes(témoins), les vaches séropositives à *N. caninum* (exposées) et les vaches séronégatives à *N. caninum* (non exposées). On peut ainsi calculer un *odd* (une cote) d'exposition pour les cas et les témoins ainsi que le rapport de ces cotes encore appelé *odds ratio* (OR). L'OR est une valeur comprise entre 1 et +∞. Ainsi un OR de 5 signifie que l'odds d'exposition est 5 fois plus élevé chez les cas que chez les témoins. Plus l'OR est élevé plus l'association entre la maladie et l'exposition est forte. Un OR de 1 ou proche de 1 signifie qu'il n'y a pas d'association entre le facteur d'exposition et la maladie ***(TOMA et al., 2001).*** La population cible est constituée de vaches locales « brunes de l'Atlas » du Nord-Est algérien. Un total de Quatre-vingt-dix exploitations ont été sélectionnées dans cette étude. Trente d'elles (n=30) étaient des fermes cas, tandis que les soixante autres étaient des témoins (n=60). Ceci correspond à un rapport de 1 cas/2 témoins. Les données ont été recueillies auprès de fermes de cas et témoins. Nous avons utilisé une face à face structuré par un entretien avec les propriétaires de fermes pour recueillir les données.

II.1.2.2. Prélèvement sanguin

Le critère de sélection était des vaches gestantes de race locale « Brune de l'Atlas ». La taille de l'échantillon a été calculée à l'aide de la formule suivante ***(THRUSFIELD, 2007) :***

$N = 1{,}96^2 P (1-P) / D^2$.

Où N était la taille de l'échantillon, 1,96 était la valeur Z pour le niveau de confiance sélectionné (95 %), P était la prévalence de la maladie individuelle, et D était la précision absolue recherchée. Une taille d'échantillon minimale de 516 animaux a été obtenue en utilisant une prévalence précedente de 34% rapporté chez la race bovine locale par ***GHALMI et al., (2011),*** une précision absolue de 4%, et un niveau de confiance 95 %. Cependant, un total de 650 animaux a été inclus dans l'étude pour augmenter la précision. Au total, 650 vaches locales « brunes de l'Atlas gestantes ont été sélectionnées dans 90 fermes appartenant à différentes régions du Nord-Est algérien. Un volume de 5 ml de sang a été prélevé de la veine jugulaire à l'aide de tubes secs de type Vacutainer (Becton-Dickinson, USA). Le sang a été centrifugé et le sérum a été transféré dans des tubes eppendorfs de 2 ml et congelés à −20°C jusqu'à analyse sérologique. Un questionnaire auprès des éleveurs a été réalisé pour obtenir un maximum de données sur les vaches prélevées (présence de chiens, antécédents d'avortement, parité, âge, couleur de robe et stade de gestation) et sur les fermes sélectionnées (général hygiène, saisons et région). Le ***tableau 4*** fournit des données recueillies lors de ces visites.

II.1.3. Analyse sérologique

Les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps dirigés contre *N. caninum* à l'aide d'une technique de dosage d'immunoadsorption par enzyme liée (ELISA) de type indirect (ID Screen ® *N. caninum* Multi-espèces indirectes ; Vétérinaire, Innovant Diagnostic, Grabels, France). Les analyses ont eu lieu au centre de recherche en biotechnologie de Constantine. Selon les données de la littérature, le test utilisé possède une sensibilité de 99,6% et une spécificité de 97,3%, pour le diagnostic sérologique de la néosporose bovine ***(ÁLVAREZ-GARCIA, 2013).***

II.1.3.1. Principe

Le principe du test consiste à mettre du sérum de l'animal à tester avec l'antigène adsorbé au fond du puits. Un conjugué anti-espèce marqué à la peroxydase (HRP) se fixe aux anticorps *Neospora*, formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-HRP, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB). La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester. Le kit utilise un extrait antigénique purifié de *N. caninum*.

Tableau 4 : Facteurs de risques liés à l'infection à *N. caninum*

Facteurs de risques	Catégories	Nombre de vache
Présence de chiens	Non	271
	Oui	379
Avortement	Oui	75
	Non	575
Classe d'âge (mois)	<36	183
	36-84	246
	≥84	221
Parité	Nullipares	190
	Primipares	225
	Multipares	235
Couleur de la robe	Noir	130
	Rouge	124
	blanche	217
	Grise	179
Stade de gestation (mois)	1-3	133
	4-6	275
	7-9	242
Hygiène de la ferme	Bonne	251
	Modérée	215
	Mauvaise	184
Saisons	Automne	140
	Hiver	157
	Printemps	200
	été	153
Région	El-Tarf	61
	Annaba	105
	Skikda	90
	Souk-Ahras	91
	Jijel	303

II.1.3.2. Matériels

Le matériels utilisés pour l'analyse sérologique est le suivants : 7 microplaques ELISA à fond plat sensibilisées avec l'antigène purifié de *N. caninum* ***(Figure 11).*** La Solution de lavage concentrée 20 fois et Conjugué coloré concentré 10 fois. Le tampon de dilution 2 (pour la dilution des sérums sanguins et des sérums de référence). Le tampon de dilution 3 (pour la dilution du conjugué). Le contrôle positif et négatif. La Solution de révélation et solution d'arrêt. micropipettes, embouts de pipettes, eau distillé, microplaques plastique, béchers, flacons de dilution, pissette et lecteur de plaque automatique (Perkin Elmer, Waltham, USA).

Figure 11 : Composition de la trousse ELISA *N. caninum* IDvet ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

II.2.4.2. Méthodes

Tous les constituants du kit ont été ramenés à température ambiante (21°C +/- 3°C) avant emploi et homogénéisés au Vortex ***(Figure 12).***

Figure 12 : Préparation des sérums ***(PHOTO PERSONNELLE, 2019)***

Pour réduire la différence de temps d'incubation entre les échantillons, nous avons préparé une microplaque de 96 puits contenant 90µl de tampon de dilution 2 dans chaque puits ***(Figure 13a)***.

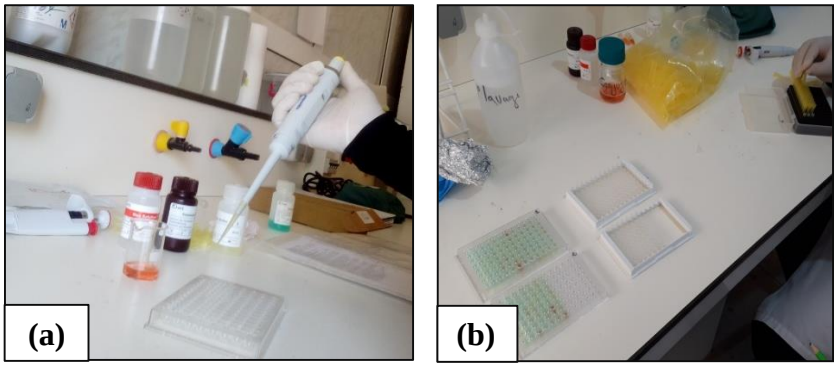


Figure 13 : Distribution de tampon de dilution 2 **(a)** et transferts des sérums dans la microplaque ELISA **(b)** ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Ensuite nous avons distribué 10µl du contrôle positif dans les cupules A1 et B1, 10µl du contrôle négatif dans les cupules C1 et D1, 10µl de chaque échantillon dans les cupules restantes. Puis nous avons transféré les sérums dilués dans la microplaque ELISA ***(Figure 13b)***. La plaque a été incubée pendant 45 minutes à température ambiante 21°C. Après la fin de l'incubation, la plaque a été vidée et lavée trois fois, chaque cupule avec environ 300µl de la solution de lavage ***(Figure 14a, b).***

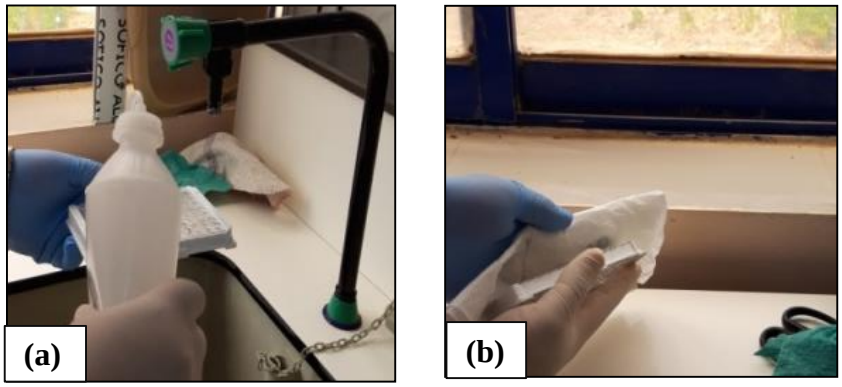


Figure 14 : lavage et séchage de la microplaque ELISA ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Ensuite nous avons procédé à la dilution du conjugué dans la solution de dilution 3 ***(Figure 15a)*** après nous avons distribué dans chaque cupule 100µl de conjugué concentré une fois ***(Figure15b).***

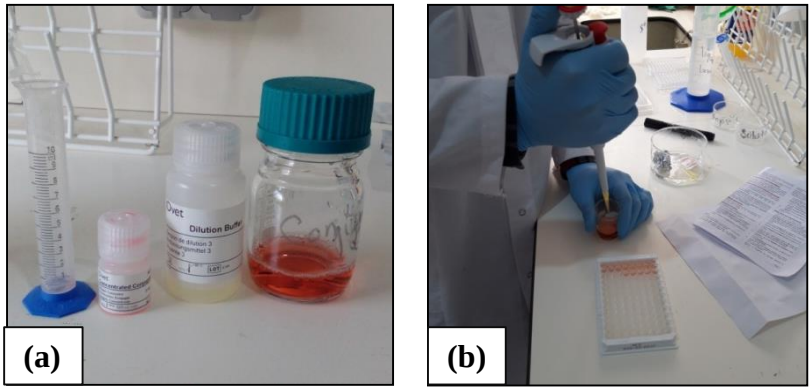


Figure 15 : Dilution (a) et distribution du conjugué (b) ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Ce Conjugué a été au préalable dilué au 1/10 dans le tampon de dilution 3. Ensuite la plaque a été incubée 30 minutes à 21°C. Après l'incubation, la plaque a été vidée et lavée trois fois avec environ 300µl de la solution de lavage. Par la suite nous avons distribué 100µl de solution de révélation dans chaque cupule . De nouveau, la plaque a été incubée pendant 15 mn à une température ambiante (21°C) et à l'abri de la lumière. A la fin de l'incubation, nous avons distribué dans chaque cupule 100µl de solution d'arrêt pour stopper la réaction ***(Figure16a,b)***

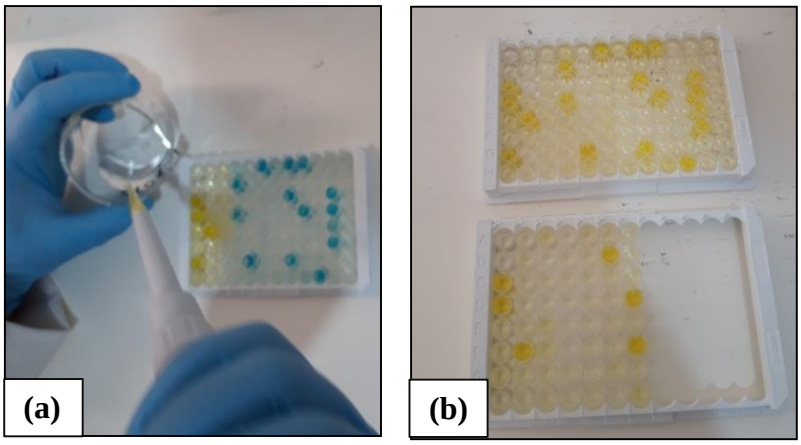


Figure 16 : Microplaque ELISA durant **(a)** et après la distribution **(b)** de la solution d'arrêt (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Les densités optiques ont été mesurées et enregistrées à 450nm à l'aide d'un lecteur de plaque automatique (PerkinElmer, Waltham, USA) à 450 nm ***(Figure17).*** Après la mesure des densités optiques des sérums positif et négatif (DO pos et DO nég) ainsi que celles de tous les échantillons (DO échantillons), la validité du test a été vérifiée selon les conditions du fabricant. On doit avoir une valeur moyenne de densité optique des contrôles positifs (DOcp) est supérieure à 0.350. Le rapport entre la moyenne des contrôles positifs (DOcp) et la moyenne des contrôles négatifs (DOcn) est supérieur à 3. Ensuite, nous avons calculé pour chaque échantillon le pourcentage S/P (S/P%) par la formule suivante :

S/P% = [(DO échantillon - DOcn) / (DOcp-DOcn)] *100.

Les échantillons présentant un S/P% : S/P% ≤ 40% : Négatif, 40% < S/P% < 50% : Douteux, S/P% ≥ 50% : Positif.

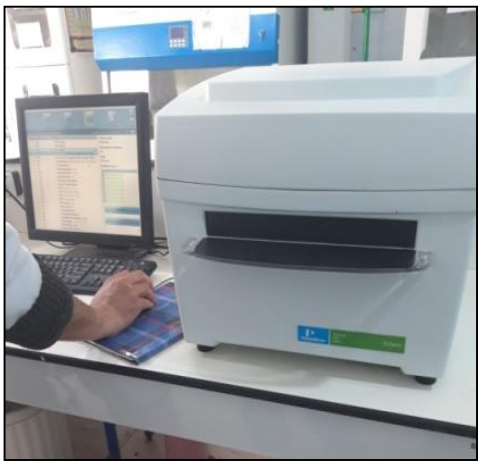


Figure 17 : Lecteur de plaque automatique (PerkinElmer, Waltham, USA) (***PHOTO PERSONNELLE, 2019)***

II.2. Etude histopathologique

II.2.1. Période et lieu d'étude

Notre étude a été effectuée durant une période de 9 mois (du mois d'Avril 2018 au mois de septembre 2019) au niveau de l'abattoir communal du chef-lieu de la wilaya de Souk-Ahras. La wilaya de Souk ahras située à l'extrémité Nord-Est du pays, près de la frontière tunisienne et à 640 km à l'Est d'Alger ***(Figure18).***

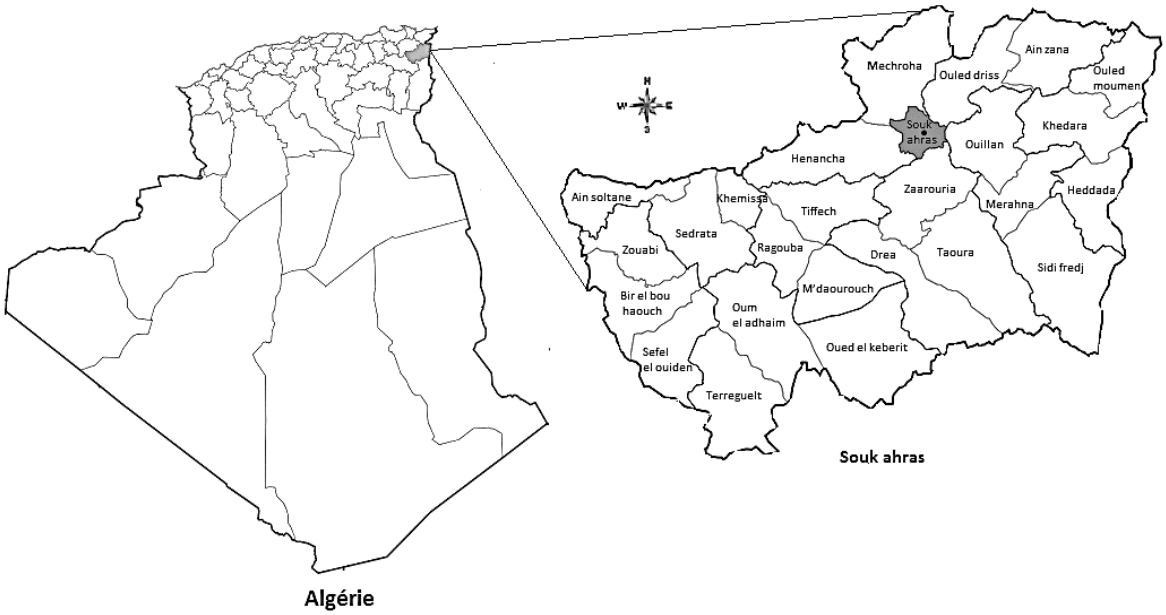
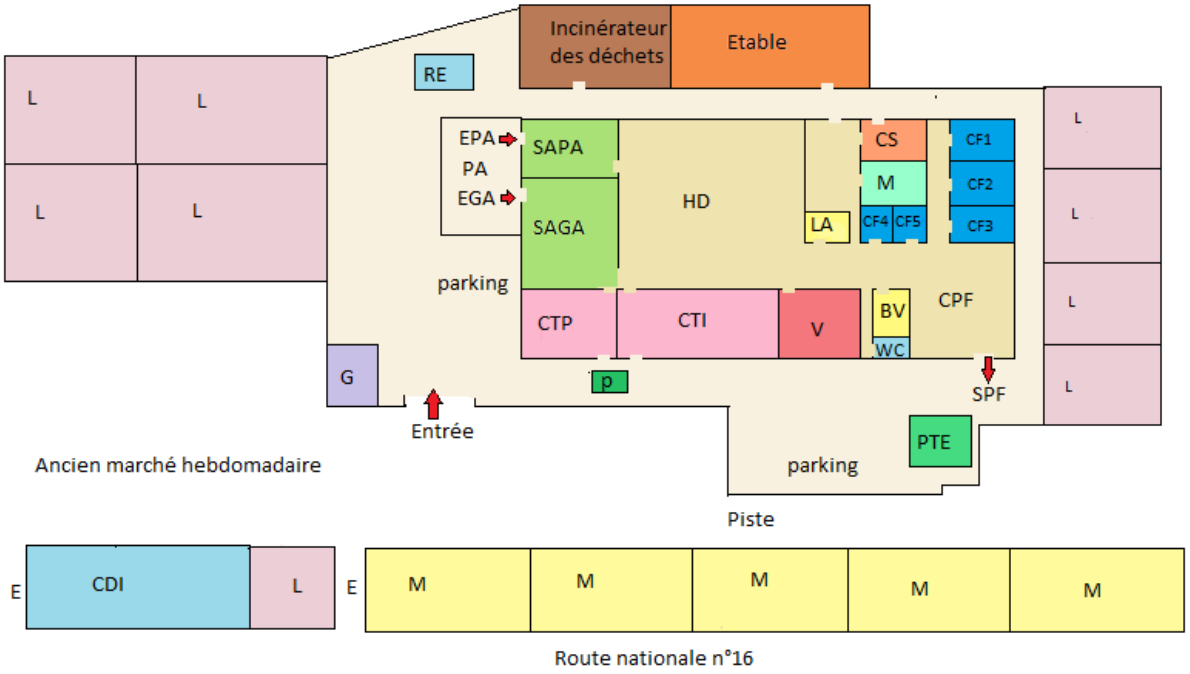


Figure 18 : Localisation de la wilaya de Souk Ahras en Algérie ***(Illustration personnelle, 2019)***

II.2.2. Prélèvement tissulaire

II.2.2.1. Description de l'abattoir

L'abattoir communal de Souk-Ahras situé au centre urbain de chef-lieu de Souk Ahras, juste à côté de l'ancien marché bestial, c'est le plus grand abattoir de la wilaya. Il est composé de trois types de locaux : locaux techniques, locaux sanitaire, local administratif. Les locaux techniques abritent les divers postes successifs de préparation des viandes. Il s'agit des locaux suivants : Parc d'attente, deux locaux d'abattage l'un pour les grands animaux et l'autre pour les petits animaux, halle de dépouillement. Le travail des carcasses se fait en position suspendue à un rail aérien, deux chambres séparées, une pour le traitement des panses et l'autre pour les intestins, 5 chambres froides à froid positif (0 à + 7 °C). Les locaux sanitaires représentés par le bureau des vétérinaires, la chambre de saisie est sous la responsabilité exclusive du vétérinaire inspecteur et un magasin pour les désinfectants ***(Figure19)***.



L : Logement
M : Magasin
G : Gardien
E : Escalé
PA : Parc d'attente
P : Poubelle
V : vestiaire
WC : toilettes

CDI : Centre d'apomixie des impôts
SAGA : Salle d'abatage des grands animaux
SAPA : Salle d'abatage des petits animaux
CTP : Chambre de traitement des panses
CTI : Chambre de traitement des intestins
CS : Chambre des saisies
EPA : Entrée des petits animaux
EGA : Entrée des grands animaux

HD : Halle de dépouillement
LA : local administratif
BV : Bureau vétérinaire
CF : chambre froide
CPF : chambre des produits finaux
SPF : Sortie des produits finaux
PTE : Poste de transformation électrique
RE : réserve d'eau

Figure 19 : Plan de l'abattoir pour bétail de Souk ahras ***(ILLUSTRATION PERSONNELLE, 2019)***

II. 2.2.2. Matériels

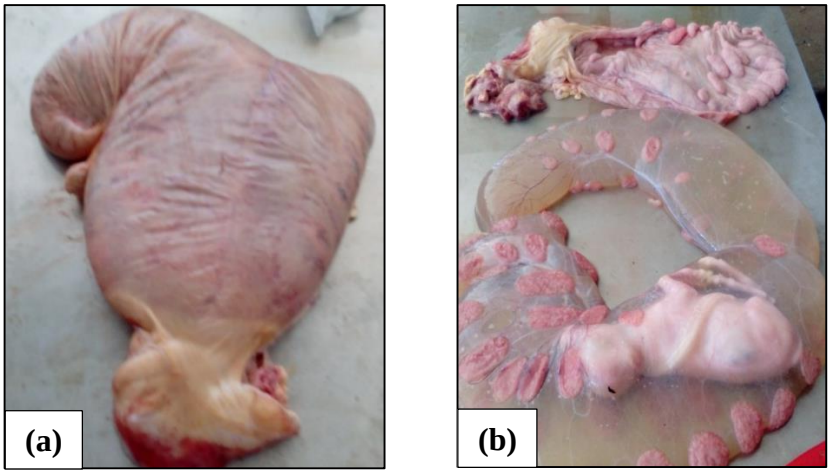
Sur un total de 410 vaches abattues (toutes races confondue) durant notre période d'étude, un nombre de 69 vaches de race locale et gestante ont fait l'objet d'une analyse sérologique pour tester la présence d'anticorps dirigés contre *N. caninum*. Parmi les 69 vaches testées, 30 étaient séropositives. Nous avons récupéré les 30 fœtus issus de ces vaches séropositives : 8 fœtus étaient de sexe femelle, 19 de sexe mâle et 3 fœtus n'étaient pas possibles pour déterminer le sexe. L'âge des fœtus varie entre 3 et 8 mois de gestation. Les femelles sont autorisées à l'abattage sous réserve de présenter un certificat d'orientation à l'abattage délivré par les services vétérinaires et validé par le docteur vétérinaire chargé des abattoirs. Le motif d'orientation de ces femelles à l'abattoir n'était malheureusement pas connu. Afin de réaliser des prélèvements de tissus placentaires et fœtaux adéquats, le matériel suivant a été utilisé ***(Figure 20)*** : un mètre ruban et une règle pour mesurer la longueur des fœtus pour déterminer leur âge, des gants d'examen pour éviter toute contamination par d'autres agents infectieux

tels *Brucella abortus*, des ciseaux, des pinces, des lames de bistouri et un porte lame pour faire des incisions au niveau des anneaux cervicaux et des cornes. Enfin, une glacière pour conserver les prélèvements au frais durant le transport.

Figure 20 : Matériel technique ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

II.2.2.3. Méthodes

Les tractus génitaux ont été prélevés et examinés juste après l'abattage des femelles ***(Figure 21a)*** . Avant l'ouverture du tractus génital, un examen macroscopique a été réalisé suivi de palpation de la partie externe de l'appareil génital. Après cet examen macroscopique externe, les utérus ont été disséqués à l'aide d'un ciseau à partir du vagin jusqu'aux cornes utérines. Ensuite, l'intérieur de l'utérus a été examiné et les enveloppes fœtales ainsi que les fœtus entiers ont été extraits ***(Figure 21b)*** .



Utérus gestant avant l'ouverture

Fœtus à l'intérieur des enveloppes foetales

Figure 21 : Examen macroscopique externe de l'appareil génital ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

L'âge et le sexe des fœtus ont été enregistrés. Le sexage des fœtus a été déterminé par visualisation des organes génitaux externes. L'âge a été estimé en mesurant la longueur

couronne-croupe (CRL) et comparer la CRL aux valeurs de référence tabulées pour la CRL et le mois correspondant de gestation ***(HABERMEHL et al., 1975 et RICHTER et al., 1978)*** et aussi le mois de gestation calculé selon l'équation donnée par ***SCHNORR*** et ***KRESSIN (2001)*** : le mois de gestation = $\sqrt{(\mathrm{CRL} + 1)} - 1.$

La longueur couronne-croupe (CRL) de chaque veau fœtal était mesuré avec le fœtus en décubitus latéral. En utilisant un ruban à mesurer, la CRL a été mesurée comme une ligne droite ***(Figure 22),*** du haut de la tête (couronne) à la première vertèbre caudale (croupe). Une autopsie a été pratiquée sur chaque fœtus.

Figure 22 : Fœtus en décubitus latéral pour la détermination de la longueur couronne-croupe (CRL) ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Le cerveau, le cœur, le foie, les poumons les muscles squelettiques, les reins, les ganglions lymphatiques, le thymus, la rate ont été prélevés en partie ou en totalité selon la taille ***(Figure 23).*** Des sections de ces organes ont été fixées dans un volume de formaldéhyde 10% jusqu'aux analyses histopathologiques.

Figure 23 : Prélèvements des organes fœtales ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

II.2.3. Analyses histopathologiques

Les analyses histopathologiques ont été réalisées à la plateforme de microscopie et diagnostic génétique au niveau du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine. Les fragments de tissus placentaires et fœtales prélevés ont subi un traitement selon les techniques histologiques classiques. Ces techniques consistent en une : fixation, enrobage à la paraffine, réalisation de coupes fines, coloration avec l'hématoxyline-éosine. Pour commencer, nous avons procédé à la préparation de la pièce en coupant une fine couche du fragment prélevé et fixé. Cette couche est par la suite, mise dans une cassette en plastique sur laquelle le numéro du prélèvement a été noté en crayon noir. La déshydratation est réalisée par une série de bains d'éthanol à l'aide d'un *automate de déshydratation* et inclusion en paraffine (Thermo Scientific, Citadel 2000, Cedex, France) qui offre une capacité de 110 cassettes ***(Figure 24).*** Cet automate permet la déshydratation progressive des échantillons fixés grâce à des bains contenant des concentrations croissantes d'alcool puis du xylène suivie de l'imprégnation dans de la paraffine liquide.

- ✓ 1er bac contient de l'alcool à 60° , échantillon maintenu pendant une heure.
- ✓ 2ème bac contient de l'alcool à 70° , échantillon maintenu pendant une heure.
- ✓ 3ème bac contient de l'alcool à 90°, échantillon maintenu pendant une heure.
- ✓ 4ème bac contient de l'alcool à 95°, échantillon maintenu pendant une heure.
- ✓ 5ème bac contient de l'alcool absolu, échantillon maintenu pendant une heure.
- ✓ 6ème bac contient de l'alcool absolu, , échantillon maintenu pendant une heure.

L'alcool (éthanol) est ensuite remplacé par un solvant miscible à la paraffine : il s'agit du xylène

- ✓ 7ème bac contient du xylène, échantillon maintenu pendant une heure.
- ✓ 8ème bac contient du xylène, échantillon maintenu pendant une heure.

Figure 24 : Automate de déshydratation et inclusion en paraffine ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

L'inclusion confère à l'ensemble « pièce-paraffine » une consistance homogène. Les prélèvements ont été imprégnés dans de la paraffine liquide à 56°c pendant 12 heures. Les prélèvements ont été extraits de la paraffine et de l'automate *de déshydratation* et inclusion en paraffine. Les prélèvements ont été mis dans des cassettes, ensuite la paraffine est fondue avec un appareil automatique (Thermo Scientific, Histo Star™, Cedex, France) ***(Figure 25)***. Le Refroidissement des cassettes pour former un bloc de paraffine a été fait sur une plaque froide. Les blocs de paraffine *sont prêts à* être découpés ***(Figure26).***

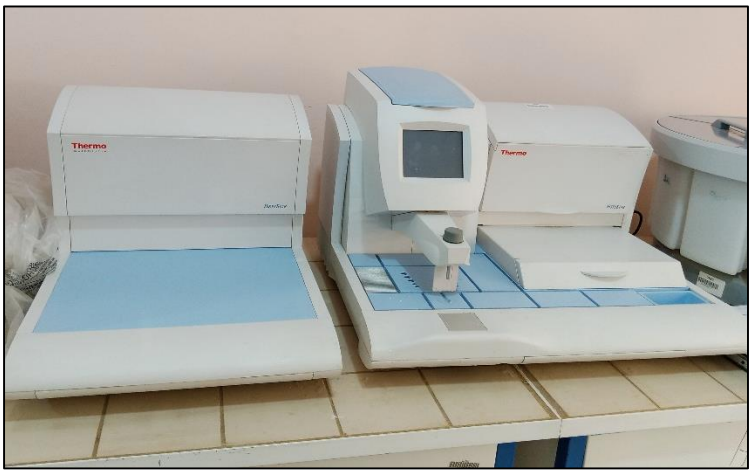


Figure 25 : Appareil de moulage des pièces dans la paraffine (Thermo Scientific, Histo Star™) ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Figure 26 : Pièces dans les blocs de paraffine après inclusion (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

L'étape ultime était d' isoler les coupes du bloc de paraffine. Pour cela un microtome (Leica Biosystems, RM 2235, Deer Park, USA) ***(Figure 27a)*** a été utilisé pour faire avancer le bloc sur un rasoir : le bloc avance d'environ 5um à chaque fois. L'ensemble des tranches ont formé

un ruban dans lequel on retrouve des coupes sériées de prélèvement tissulaire ***(Figure 27b)***. Le ruban obtenu par microtomie est rapidement mis dans un bain d'eau thermostatée (40 C°) ***(Figure 27c)*** afin de ramollir la paraffine et permettre donc, à la coupe de se décompresser. A l'aide d'une lame de verre, portant le numéro du prélèvement, la coupe est, par la suite, récupérée *et* mises à sécher.

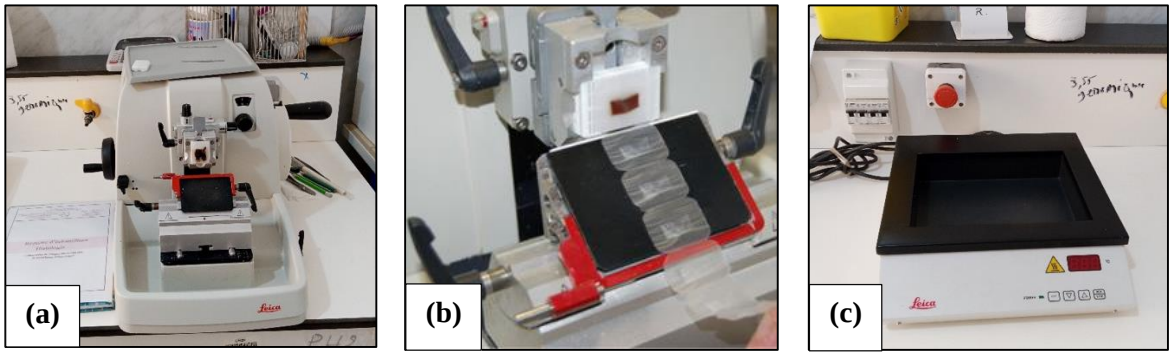


Figure 27 : Microtome **(a)**, Ruban obtenu par microtomie(b) et Bain d'eau thermostaté (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Les sections ont été colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) qui colore les noyaux en bleu et le cytoplasme en rose. La coloration est réalisée à l'aide d'un *automate* (Thermo Scientific, Varistain 24-4, Cedex, France) **(*Figure 28).*** Les lames ont été mises successivement dans des bacs qui contiennent :

- 1er bac contient xylène / 10mn
- 2ème bac contient xylène / 10mn
- 3ème bac contient l'alcool à 100° / 10mn
- 4ème bac contient l'alcool à 100° / 10mn
- 5ème bac contient l'alcool à 90° / 10mn
- 6ème bac contient l'alcool à 70° / 10 mn
- 7ème bac contient de l'eau / 1mn
- 8ème bac contient de l'eau / 1mn
- 9ème bac contient de l'eau / 1mn
- 10ème bac contient l'Hématoxyline / 4mn
- 11ème bac contient de l'eau / 1mn
- 12ème bac contient de l'eau / 1mn
- 13ème bac contient de l'eau / 1mn
- 13ème bac contient de l'alcool acide / 10 sec
- 14ème bac contient de l'eau / 1mn
- 15ème bac contient de l'eosine / 1mn
- 16ème bac contient de l'eau /1mn
- 17ème bac contient de l'eau / 1mn
- 18ème bac contient de l'eau / 1mn
- 19ème bac contient l'alcool à 70° / 5mn
- 20ème bac contient l'alcool à 100° / 5mn
- 21ème bac contient l'alcool à 100° / 5 mn
- 22ème bac contient xylène / 5mn
- 24ème bac contient xylène / 5mn

Figure 28 : Automate de coloration *(*Thermo Scientific, Varistain 24-4, Cedex, France) (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***.

Après coloration, les lames ont été couvertes par des lamelles. Les lamelles ont été adhéré aux lames avec la résine. Les lames sont prêtes à être observées ***(Figure 29).***

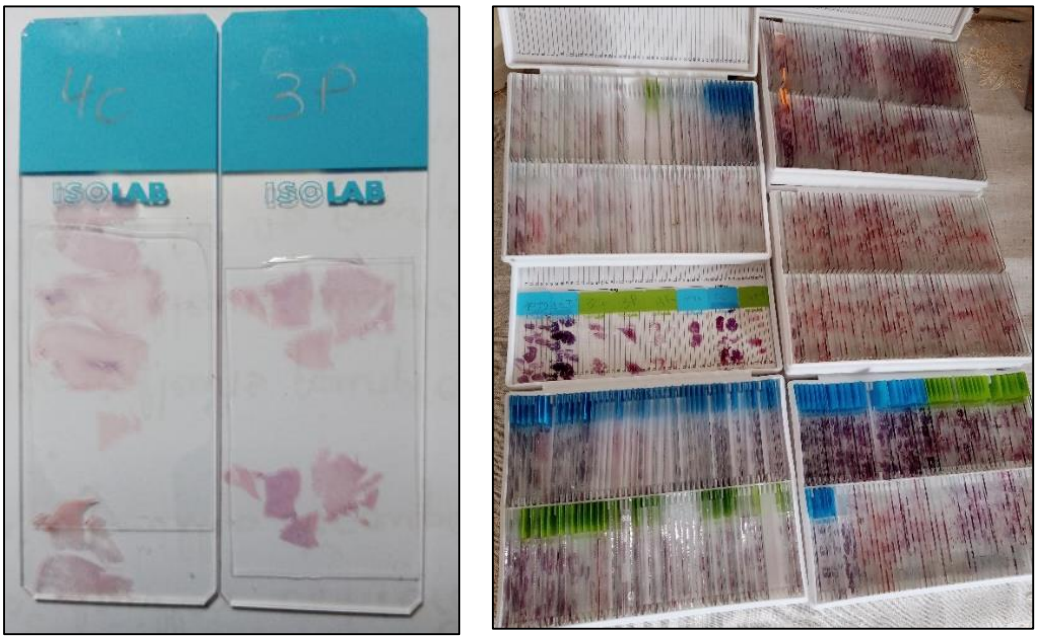


Figure 29 : Lames histologiques après étalement et colororation en hématoxyline-éosine ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Les lames sont prêtes à l'observation microscopique qui a pu être réalisée grâce au microscope optique (Leica Microsystems, DM1000 LDE, Wetzlar, Allemagne) mené avec camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) pour afficher et enregistrer l'image diffusée par le microscope sur un ordinateur ***(Figure 30).*** L'observation microscopique a été réalisé avec un grossissement faible (X 100) a un grossissement élevé (X 400).

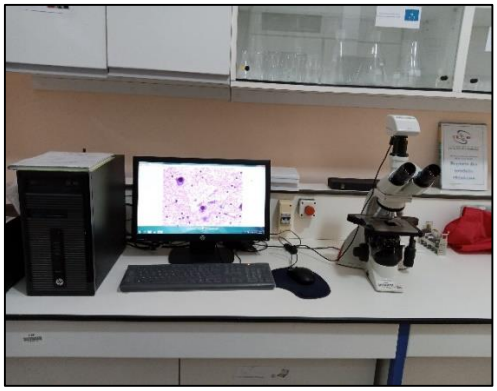
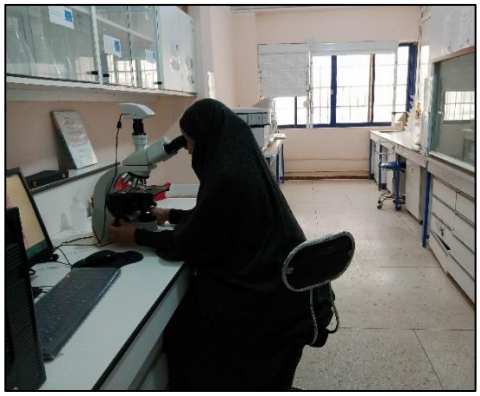



Figure 30 : Observation microscopique des lames histologiques (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

II.3. Analyses statistiques

Toutes les données ont été analysées à l'aide du Microsoft Office Excel 2016 et Package Statistique pour le Social Sciences (SPSS) (SPSS. v.20, Chicago, Illinois, États-Unis). La séroprévalence obtenue au niveau des fermes a été déterminée par le ratio de fermes positives sur le nombre total de fermes visitées. Un élevage était considéré comme positif s'il contenait au moins une vache séropositive. La séroprévalence des vaches a été mesurée par le nombre de vaches séropositives sur le nombre total de vaches prélevées. L'IC de 95% a été calculé à l'aide de la formule suivante : CI=P ± Pa. P est la séroprévalence attendue. Pa est la précision absolu précision. Pa a été calculé en utilisant les éléments suivants formule :

Pa =1.96* P (1− P) / n. La relation entre la séroprévalence vis-à-vis de *Neospora caninum* et les facteurs de risque a été déterminée à l'aide de modèles de régression logistique multivariable ***(FAGERLAND et HOSMER, 2016)***. En premier temps, nous avons procédé à une analyse univariée des variables par le test du chi carré et l'odds ratio (OR). Ensuite les variables qui présentaient $P \leq 0,2$ (mésuré par le test de vraisemblance) ont été soumises à analyse multivariée. Des valeurs de $p < 0,001$ et $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. L'ajustement global de la régression logistique modèles a été testé avec le test de Hosmer-Lemeshow. Les valeures de l'Odds Ratio sont estimées comme suit : OR >1 : existence d'un risque augmenté , OR <1 : risque diminué. L'hypothèse nulle testée est : Ho : OR =1, Contre l'alternative H1 : OR ≠1. Lorsque l'OR était supérieur à 1 et $p \leq 0,05$, les variables étaient considérées comme des facteurs de risque. En plus de la régression logistique, L'analyse des correspondances multiples (MCA) a également été effectuée. C'est une présentation graphique permettant d'étudier le lien entre plusieurs variables qualitatives ***(GREENACRE, 2016).***

III. Résultats

III.1. Etude Séro-épidemiologique

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la séroprévalence et aux avortements chez la vache puisqu'il s'agit de la manifestation clinique la plus importante de *N. caninum* dans l'espèce bovine. Dans un second temps, nous avons analysé les facteurs qui pouvaient influencer la séroprévalence

III.1.1. Séroprévalence

Sur les 90 fermes visitées, 73 étaient séropositives à *N. caninum*, et 17 fermes séronégatives, soit une séroprévalence estimée de 81,1% (IC : 73,0-89,2 %) ***(Figure 30)***. Une ferme était considérée comme positive si au moins un animal était séropositif.

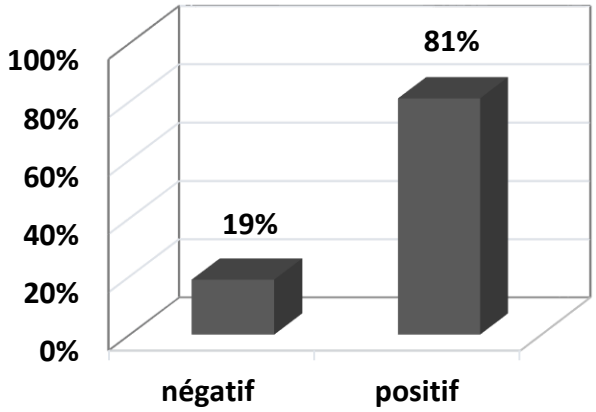


Figure 31 : Pourcentage des Fermes séropositives et séronégatives

Si on considère la séroprévalence sur le plan individuel, les résultats ont montré que 235 vaches gestantes sur les 650 testées sont séropositives à *N. caninum* par la technique ELISA indirect, ce qui correspond à une séroprévalence de 36,2% (IC à 95 % : 32,7-39,8 %) ***(Figure 32)***. Le degré de positivité des sérums positifs a varié (le seuil fixé à 50% par le fabricant) comme illustré dans la ***Figure 33.***

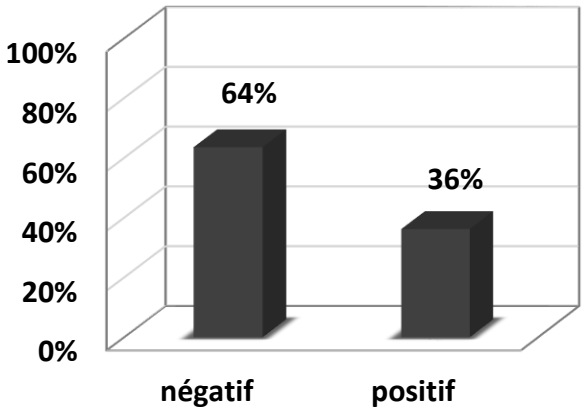


Figure 32 : Pourcentage des vaches séropositives et séronégatives

Nous constatons que le seuil de positivité de 48% des animaux testés positifs se situe dans l'intervalle 50-70 % et 31.5% des sérum avec un degré de positivité supérieur à 90 % ***(Figure 33).***

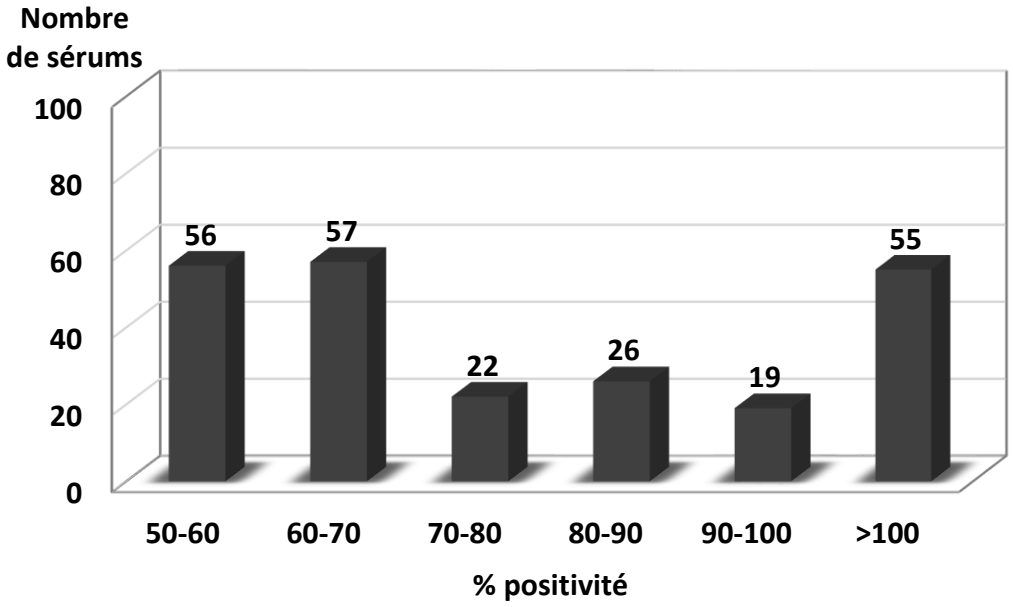


Figure 33 : Nombre de sérums positifs en fonction du pourcentage de positivité

III.1.2 Etude cas-témoins

Afin de vérifier si *N. caninum* était une cause d'avortement chez la vache, nous avons réalisé une étude cas-témoins avec comme facteur d'exposition la séroprévalence à *N. caninum*. Un total de 90 fermes a été étudié. Sur la base d'un questionnaire épidémiologique les fermes étaient séparées en fermes témoins et en fermes cas. Les fermes cas sont définies comme des fermes ayant eu des problèmes d'avortement au courant des cinq dernières années. Les fermes témoins sont celles qui n'ont pas connu d'épisodes d'avortements sur les cinq dernières années. Lors de cette étude, nous avons analysé 30 fermes cas et 60 fermes témoins. Ceci correspond à un rapport de 1 cas/2 témoins ***Tableau 5.***

Au niveau des fermes, 261 vaches ont été prélevées à partir des fermes cas et 389 vaches prélevées dans les fermes témoins. Des analyses sérologiques ont été réalisées pour détecter les sérums positifs vis-à-vis de *N. caninum.* Une ferme est considérée comme positive si au moins un animal était séropositif.

Tableau 5 : Caractéristiques des fermes

Statut des fermes	Nombre de fermes prélevées(%)	Nombre de vaches prélevées(%)
Cas	30(33,33)	261(40,16%)
Témoin	60(66,66)	389(59,84)
Total	90	650

Comme dèjà mentionné plus haut, parmi les 650 sérums analysés, 235 se sont montrés positifs à *N.caninum* correspondant à une séroprévalence globale de 36,2% (IC à 95 % : 32,7-39,8 %). Parmi les 235 positifs, 89 soit 37,9% (IC à 95 % : 31,67- 44,07 %) appartenaient à des fermes cas et 146 soit 62,1% (55,93%-68,33%) provenaient de fermes témoins ***(Tableau 6).*** Au moins un animal séropositif a été trouvé dans 73 fermes (81,11%) ; plus particulièrement 24/30 fermes cas (80%) et 49/60 fermes témoins (81,7%). La séroprévalence dans les fermes a varié de 0 à 100% avec une moyenne de 37,5% dans les fermes témoins et de 34,10% dans les fermes cas.

Tableau 6 : Séroprévalence en fonction du statut des fermes

Statut de la ferme	Nombre de fermes (%)	Fermes +	Nombre de vaches prélevés	Vaches +	Séroprévalence (%) IC 95%
Témoin	60	49	389	146	37,50 (32,72-42,34)
Cas	30	24	261	89	34,10 (28,35-39,85)
Total	90	73	650	235	36,20 (32,70-39,80)

Dans un second temps, nous avons calculé l'association entre l'exposition à *N. caninum* et le fait d'observer des avortements dans la ferme. Comme le montre le ***tableau 7***, le lien entre la séroprévalence et l'avortement a été calculé par l'Odd Ratio (OR) qui a montré une valeur de 0,9 (IC à 95 % : 0,3-2,7) indiquant l'absence d'association entre la séroprévalence de *N. caninum* et la présence d'événements d'avortement dans les fermes prélevées. La séroprévalence de *N. caninum* était pratiquement similaire dans les élevages témoins que dans les élevages cas.

Tableau 7 : Association entre la séroprévalence et les avortements au niveau des fermes

Test	Fermes cas	Fermes témoins
Séropositives	24	49
Séronégatives	6	11
Total	30	60
Séroprévalence	80%	81,7%
Odds ratio	0,9 (IC à 95% : 0,3-2,7)	

Si on considère la situation sur le plan individuel, l'enquête épidémiologique nous a indiqué que sur les 650 vaches prélevées, 575 vaches n'avaient pas avorté (vaches témoins) et 75 vaches reconnues avoir récemment avorté (vaches cas). Un total de 260 (40,1 %) vaches provenaient de fermes cas et 389 (59,9 %) étaient issues de fermes témoins. Comme le montre le ***tableau 8***, l'OR obtenu était de 0,8 (IC à 95% 0,6-1,2), ce qui signifie encore une fois qu'aucune association statistiquement significative n'a été mise en évidence entre la séropositivité à *N. caninum* et les avortements chez les vaches locales, par conséquent, l'exposition à *N. caninum* n'est pas synonyme avortement chez cette race.

Tableau 8 : Association entre la séroprévalence et les avortements au niveau individuel

Test	Les vaches prélevées dans les fermes cas	Les vaches prélevées dans les fermes témoins
Séropositives	89	146
Séronégatives	172	243
Total	261	389
Séroprévalence	34,1%	37,5%%
Odds ratio	0,8 (IC 95% : 0,6-1,2)	

III.1.3. Etude des facteurs de risque

III.1.3.1. Présence de chiens

Puisque le chien transmet *N. caninum* aux bovins, il était important de tester si sa présence dans l'environnement des vaches avait une influence sur la séroprévalence. On constate que la présence de chien est significativement associée avec la séroprévalence chez le bovin ($p<0,01$). Le calcul de l'OR en considérant l'exposition au chien en fonction de la séropositivité, montre une valeur de 3,5 (IC à 95% : 2,5-5.1), ce qui signifie que la probabilité d'avoir une vache séropositive est significativement plus importante en présence de chiens. Le **tableau 9** résume ces données.

Tableau 9 : Séroprévalence en fonction de la présence de chiens.

Chiens	Nombre de vaches (%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
Absence	271	55	20,3(15,5-28,1)	Référence	<0.001
Présence	379	180	47,5(42,5-52,5)	3,5(2,5-5,1)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

III.1.3.2. Avortement

Parmi les 650 vaches prélevées, 75 ont subi au moins un avortement au courant de leur vie de reproduction. La séroprévalence en fonction du fait que la vache ait avorté ou non ***(tableau 10)***, ne montre aucune association significative ($p>0,05$). En d'autres termes, l'avortement et la séropositivité vis-à-vis de de *N. caninum* ne semblent pas liés**.**

Tableau 10 : Séroprévalence en fonction de l'avortement de la vache**.**

Avortement	Nombre de vaches (%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
Ayant avorté	75	28	37,3(26,4-48,3)	Référence	0.82
N'ayant pas avorté	575	207	36,0(32,8-39,9)	1,0 (0,6-1,7)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

III.1.3.3. Age

Nous avons étudié la séroprévalence vis-à-vis de *N.caninum* en fonction de la classe d'âge des vaches. Les classes d'âge ont été réparties comme suit : <36 mois ; 36-84 mois ans, 84 mois

et plus selon la classification de ***ROMERO et al.(2002).*** Les résultats montrent que la séroprévalence augmente avec l'âge ***(Tableau 11).*** En effet, l'étude des OR (3,8 ; CI à 95% 2,7-5,8) montre que l'âge de 84 mois et plus, constitue un facteur de risque de contracter une infection par *N.caninum* alors que pour l'âge inférieur à 84 mois, la situation est différente puisqu'aucune association statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre la séroprévalence et l'âge.

Tableau 11 : Séroprévalence en fonction de la classe d'âge

Classe d'âge (mois)	Nombre de vaches (%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
<36	183	45	24,6(18,3-30,8)	Référence	<0.001
36-84	246	68	27,6(22,0-33,2)	1,2 (0,8-1,8)	
84 et plus	221	122	55,2(48,6-61,8)	3,8 (2,7-5,8)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

III.1.3.4. Parité

Nous avons voulu vérifier si la parité influençait sur la séropositivité vis-à-vis de *N. caninum.* Les résultats indiquent ***(Tableau 12)*** qu'ils existent une association significative entre la séroprévalence et la multiparité (p>0,05). En effet, le calcul de l'OR, montre une valeur de 2,9 (IC à 95% : 1,9-4,4) pour les vaches multipares alors que pour les vaches nullipares et primipares aucune association significative n'a pu être mise en évidence.

Tableau 12 : Répartition de la séroprévalence en fonction de la parité

Parité	Nombre de vaches (%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
Nullipare	190	50	26,3(20,0-32,6)	Référence	<0.001
Primipare	225	65	28,9 (23,0-34,8)	1,1 (0,7-1,7)	
Multipare	235	120	51,1 (44,7-57,5)	2,9 (1,9-4,4)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

III.1.3.5. Couleur de la robe

L'étude de la couleur de la robe des vaches ***(Tableau 13)*** a montré une association significative entre la couleur de la robe et la séroprévalence. Le calcul de l'OR, montre des valeurs de 2,1 (1,3-3,4) et 2,4(1,4-3,8) pour la robe blanche et la robe grise respectivement. Alors que pour les vaches avec la robe rouge et noire aucune association significative n'a pu être mise en évidence.

Tableau 13 : Répartition de la séroprévalence en fonction de la couleur de la robe

Couleur de la robe	Nombre de vaches (%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
Noire	130	36	27,7(20,0-35,4)	Référence	<0.001
Rouge	124	16	12,9 (07,0-18,8)	0,4(0,2-0,7)	
Blanche	217	98	45,2 (38,5-51,8)	2,1(1,3-3,4)	
Grise	179	85	47,2 (40,2-54,8)	2,4(1,4-3,8)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

III.1.3.6. Stade de gestation

Notre étude a porté essentiellement sur des vaches gestantes, nous avons voulu analyser le stade de gestation pour vérifier s'il influençait sur la séropositivité vis-à-vis de *N. caninum* ***(Tableau 14).*** Les résultats n'ont pas montré d'association significative pour le premier stade de gestation (1-3 mois) (p<0,01), toutefois, elle devient significative (p<0,01) pour les stades suivants. Le calcul des Odds Ratios a montré des valeurs de 2,6 (IC ?) et 1,9(IC ?) pour le stade 2 (entre 4-6 mois) et stade 3 (entre 7-9 mois) respectivement témoignant d'une séroprévalence plus élevée observée chez les vaches à la mi gestation et en fin de gestation.

Tableau 14 : Répartition de la séroprévalence en fonction du stade de gestation

Stade de gestation (mois)	Nombre de vaches (%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
1-3	133	30	22,6(15,4-29,7)	Référence	<0.001
4-6	275	118	42,9 (37,1-48,8)	2,6 (1,6-4,1)	
7-9	242	87	36,0(29,9-42,0)	1,9 (1,2-3,1)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

III.1.3.7. Hygiène

Pour l'hygiène de la ferme, nous avons essentiellement tenu compte de l'entretien des locaux et des animaux, nous avons ainsi classé les fermes en trois catégories (hygiène bonne, moyenne et mauvaise). L'état sérologique en fonction l'hygiène de la ferme est repris dans la ***Figure 34.*** Une association significative (p<0,01) entre l'état d'hygiène et la séroprévalence a été relevée. L'étude des OR montre qu'un bon état d'hygiène peut avoir un effet protecteur contre une infection *N.caninum* ***(Tableau 15).***

Tableau 15 : Effet de l'état d'hygiène sur de la séropositivité

Etat d'hygiène	Nombre de vachees(%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
Bon	251	55	21,9(16,8-27,0)	Référence	<0.001
Modéré	215	80	37,2 (30,7-43,7)	1,1 (0,7-1,7)	
Mauvais	184	100	54,3 (47,1-61,5)	4,2(2,8-6,4)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

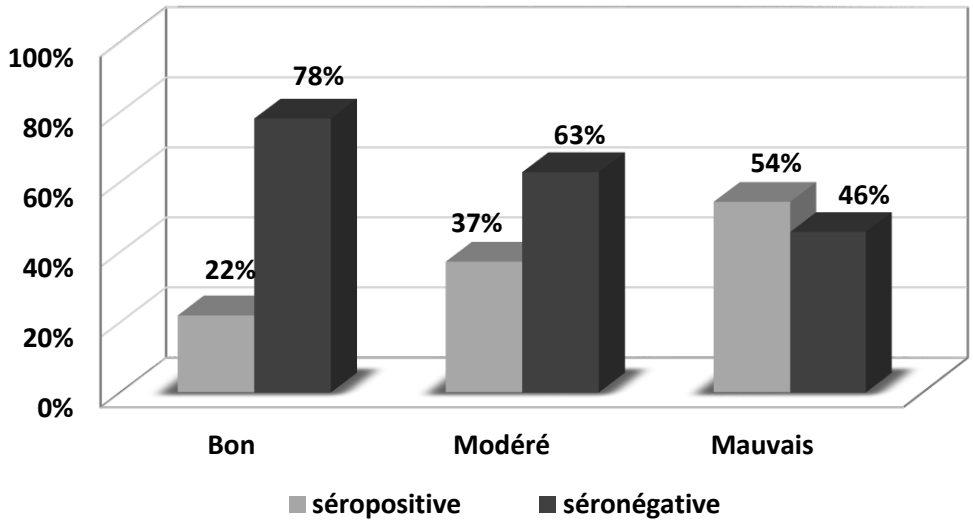


Figure 34 : Pourcentages de séropositifs et de séronégatifs en fonction de l'état d'hygiène

III.1.3.8 Région

Sur le plan géographique, nos prélèvements ont concerné des régions de l'Est du pays avec cinq régions sélectionnées : Jijel, Skikda, Souk-Ahras, Annaba et d'El-Tarf, situées à l'extrémité Nord-Est du pays. Nous avons calculé la séroprévalence vis-à-vis de *N. caninum* par région ***(Figure 35).***

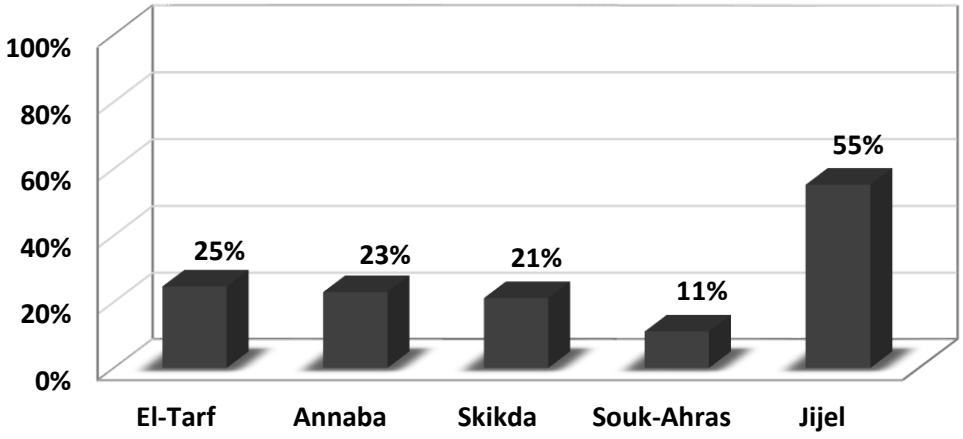


Figure 35 : la séroprévalence en fonction de la région

Une association significative a été mise en évidence entre la région prélevée et la séroprévalence ($p<0,01$). Celle-ci était plus importante dans la région de Jijel comparativement aux autres régions ***(Tableau 16).***

Tableau 16 : Répartition de la séroprévalence en fonction de la région

Etat d'hygiène	Nombre de vaches (%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
El-Tarf	61	15	24,6 (13,8-35,4)	Référence	<0.001
Annaba	105	24	22,9 (14,9-30,9)	0,9(0,4-1,9)	
Skikda	90	19	21,1 (12,7-29,5)	0,8(0,4-1,8)	
Souk-Ahras	91	10	11,0 (4,6-17,4)	0,4(0,1-0,9)	
Jijel	303	167	55,1(49,5-60,7)	3,8(2,0-7,0)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

III.1.3.9. Saison

L'effet de la saison sur la séropositivité à *N. caninum* a également été étudié ***(Tableau 17)***. Globalement, il y a une association significative (p<0,01) entre la saison et le taux de séropositivité obtenu. L'OR a été calculé par saison, nous avons mis en évidence un effet protecteur de l'été sur la séropositivité avec un OR<1 (p<0,01). Alors qu'au printemps, l'effet obtenu est plutôt favorisant avec un OR>1 (p<0,01). En revanche, en hiver et en automne, aucun effet n'a pu être mis en évidence.

Tableau 17 : Effet de la saison sur la séropositivité

Couleur de la robe	Nombre de vaches (%)	Nombre de vaches +	Séroprévalence % (CI à 95%)	OR (CI à 95%)	p
Automne	140	44	31,4(23,7-39,1)	Référence	<0.001
Hiver	157	49	31,2 (24,0-38,5)	1(0,6-1,6)	
Printemps	200	104	52,0(45,1-58,9)	2,4(1,5-3,7)	
Été	153	38	24,8 (18,0-31,7)	0,7(0,4-1,2)	
Total	650	235	32,2(32,7-39,8)		

III.1.3.10. Résumé de l'étude sur les facteurs de risque

Comme nous l'avons montré ci-dessus et après l'analyse uni-variée, celle-ci fait ressortir 11 facteurs de risque potentiels en faveur d'augmenter le risque d'une exposition à *N. caninum*, citons : la présence de chiens ; la classe d'âge ≥84 mois ; la saison (le printemps); la multiparité; la région (Jijel) ; la couleur de la robe (blanche et grise) ; l'état d'hygiène (modéré et mauvais) et le stade de gestation (second et le dernier trimestre). Ces facteurs ont donc été sélectionnés pour des analyse de régression logistique ***(Tableau 18).*** Les résultats de cette analyse étaient : présence de chiens (OR 4,7 ; IC à 95% : 2.9-7.3) ; âge ≥ 84 mois (OR 4,9 ; IC à 95% : 2,8-8,3) ; région de Jijel (OR 2,2 ; IC à 95% : 1,1-4,5) ; couleur blanche (OR 2,5 ; IC à 95% : 1,4-4,4) ; robe grise (OR 2.5, 95 CI 1.4- 4.5) ; hygiène modérée (OR 2,30, 95 IC 1,4-3,8) ; hygiène mauvaise (OR 3.1, 95 IC 1.8-5.3) ; second stade de gestation **(**OR 2,5, 95

IC 1,4-4,4) ; et dernier stade de gestation (OR 2,3, 95CI 1,3-4,2). Le modèle était un bon ajustement pour les données (test de Hosmer et Lemeshow avec Chi-carré=8,9 ; df=8 ; p=0,3).

Tableau 18 : Facteurs de risque (modèle final de régression logistique) associés à la séropositivité à *Neospora caninum* chez les vaches gestantes locales du Nord-Est algérien.

Facteurs de risque	B	SE	Odds ratio	Intervalle de confiance 95%	Valeur p
Présence des chiens	1.5	0.2	4.7	3.0-7.3	<0.001
Age ≥84 mois	1.6	0.3	4.9	2.8-8.3	<0.001
Région de Jijel	0.8	0.4	2.2	1.1-4.5	<0.001
Robe blanche	0.9	0.3	2.5	1.4-4.4	<0.001
Robe grise	0.9	0.3	2.5	1.4-4.5	<0.001
Hygiène modérée	0.8	0.2	2.3	1.4-3.8	<0.001
Hygiène mauvaise	1.1	0.3	3.0	1.8-5.3	<0.001
Second stade de gestation	0.9	0.3	2.5	1.4-4.4	<0.001
Dernier stade de gestation	0.8	0.3	2.3	1.3-4.2	<0.001

B= Coefficient de régression, SE= Erreur standard, Rapport de vraisemblance 591,2, test d'ajustement du chi carré = 8,9 ; df=8 ; p=0,3

III.1.3.11. Analyse en correspondances multiples

L'analyse en correspondances multiples (ACM) a été réalisée sous forme de nuage de points pour illustrer visuellement les groupements de variables à la séropositivité ou à la séronégativité ***(Figure 36).***

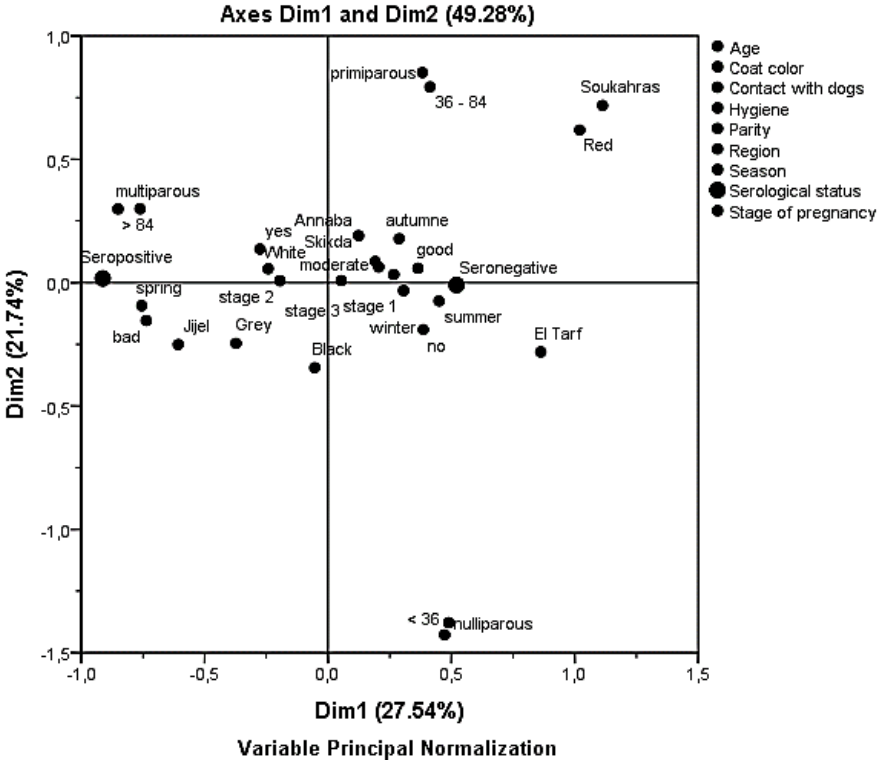


Figure 36 : Analyse en correspondances multiples (MCA) des facteurs associés à la séroprévalence vis à vis de *Neospora caninum*

En l'ACM, la présence de chiens (oui), robe blanche et grise, second et dernier trimestre de la gestation (stades 2 et 3), région de Jijel, mauvaise hygiène, printemps, âge ≥84 mois et la multiparité des vaches ont été regroupés avec la séropositivité. En revanche, l'absence de chiens (non), saisons automne, l'hiver et été, région d'Annaba et de Skikda, premier trimestre de gestation (stade 1) et enfin, hygiène bonne et modérée ont été regroupées avec la séronégativité. Les autres facteurs n'étaient pas associés à la sérologie : robe rouge, robe noire, région de Souk-Ahras, région d'El-Tarf, âge <36 mois, âge entre 36 et 84 mois, vaches primipares et nullipares.

III.2. Étude histopathologique

La détection de lésions compatibles avec *N. caninum* par examen histologique dans le cerveau, le cœur ou le foie représente une des approches pour le diagnostic sur l'avorton ***(ORTEGA-MORA et al., 2006).*** Nous avons utilisé cette méthode de diagnostic chez des fœtus issus de vache séropositive a *N. caninum.* Les organes prélevés étaient, le cerveau, le cœur et le foie, mais aussi la rate, les poumons, les muscle squelettiques, les reins et les cotylédons placentaires. Parmi les 30 fœtus bovins analysés, un nombre de n=6s'est montré positif à l'histopathologie ***(Tableau 19).*** Au total, 10/239 (4,18%) échantillons ont présenté des lésions caractéristiques d'une infection par *N. caninum.*

Tableau 19 : Localisation des lésions microscopiques des 6 fœtus bovins issus de vache séropositives à *N. caninum*

Fœtus	Cerveau	Cœur	foie	Muscle squelettique	Placenta
N°2	+	-	+	-	-
N°5	-	+	-	+	-
N° 7	+	-	-	-	-
N°9	-	-	-	+	-
N°11	+	+	-	+	-
N°22	-	-	-	-	+

Nous avons constaté que le cerveau et les muscles squelettiques sont les deux organes les plus touchés par le parasite (3/6) suivie par le cœur (2/6) tandis que le foie et le placenta, les analyses montrent qu'ils sont les moins touchés (1/6). Dans 9/10 des fœtus positifs, des structures ressemblant à des kystes à bradyzoïte ont été identifiées. Les lésions des tissus placentaires et fœtales sont présentées comme suit :

III.2.1. Lésions placentaires

III.2.1.1. Lésions macroscopiques

Aucune lésion macroscopique n'a été observée dans aucun des placentas.

III.2.1.2. Lésions histopathologiques

Sur le plan histologique, parmi les 30 placentas examinés, un seul placenta (placenta du fœtus 22) semble être positif. En effet, sur le cotylédon placentaire, nous avons observé une structure tissulaire semblable à un kyste à bradyzoïte. Les images ci-dessous sont représentatives de cette observation ***(Figure 37).***

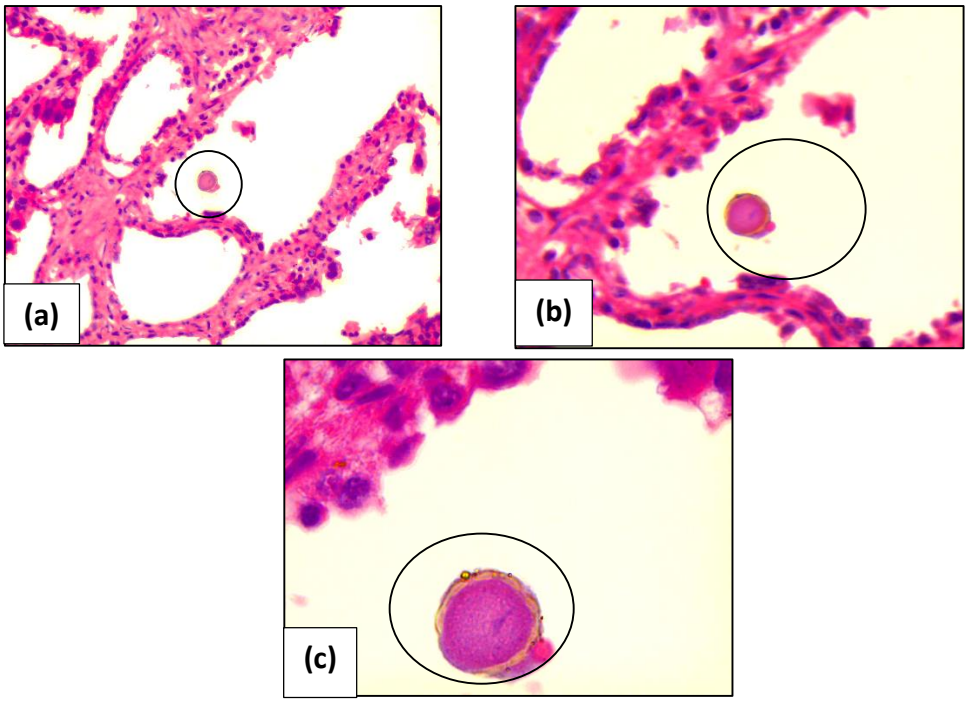


Figure 37 : Structure similaire à un kyste tissulaire a bradyzoïte de *Neospora caninum* dans le tissu placentaire du fœtus n° 22 : (a) G à X 200, (b) G à X400, (c) G à X1000. ***(PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

III.2.2. Lésions fœtales

III.2.2.1. Lésions macroscopiques

L'observation macroscopique des 30 fœtus collectés n'a pu montrer la présence d'aucune lésion macroscopique .

III.2.2.2. Lésions histopathologiques

III.2.2.2.1. Lésions cérébrales

Sur le plan histologique, parmi les 30 cerveaux étudiés, nous avons visualisé des foyers d'infiltration leucocytaire (cerveau du fœtus n° 2) et des structures tissulaires semblables à un kyste à bradyzoïte (cerveau du fœtus n°7 et n°11). Nous avons noté la présence dans le cerveau du fœtus n°2 une encéphalite non suppurative caractérisée par une infiltration de cellules mononuclées autour d'une aire centrale de nécrose. Il s'agit bien d'une lésion caractéristique de la néosporose située dans le système nerveux central ***(Figure 38).***

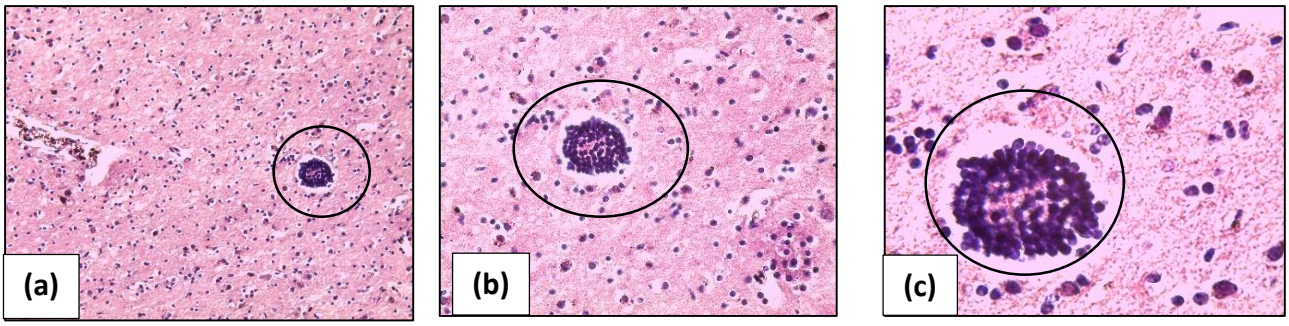


Figure 38 : Lésion inflammatoire avec point central de nécrose dans le cerveau du fœtus n°2: (a) G à X 100, (b) G à X 200, (c) G à X 400 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Des kystes intra tissulaires compatibles morphologiquement à des kystes à bradyzoïte de *N. Caninum* ont été observés dans le cerveau du fœtus n° 7 ***(Figure 39)*** et le cerveau du fœtus n°11 ***(Figure 40).*** Ces kystes sont dépourvus de cloison (septum).

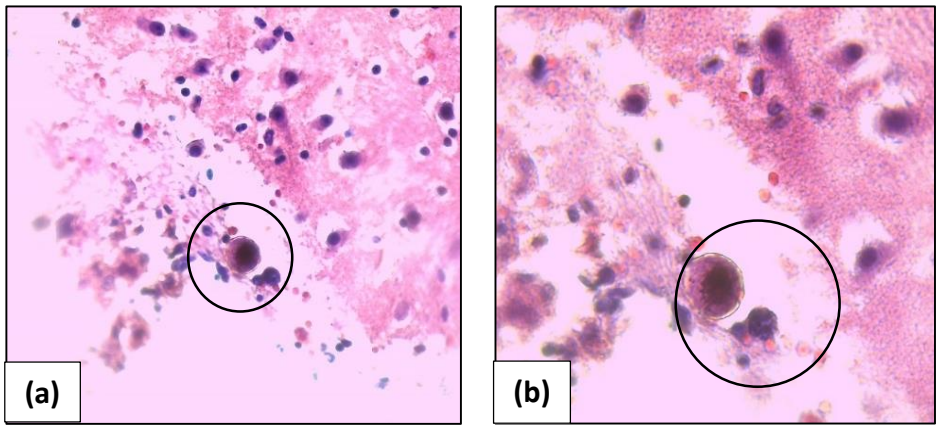


Figure 39 : Structure semblable à un kyste tissulaire à bradyzoïte de *N. caninum* dans le cerveau du fœtus n° 7 : (a) G à X 200, (b) G à X400 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

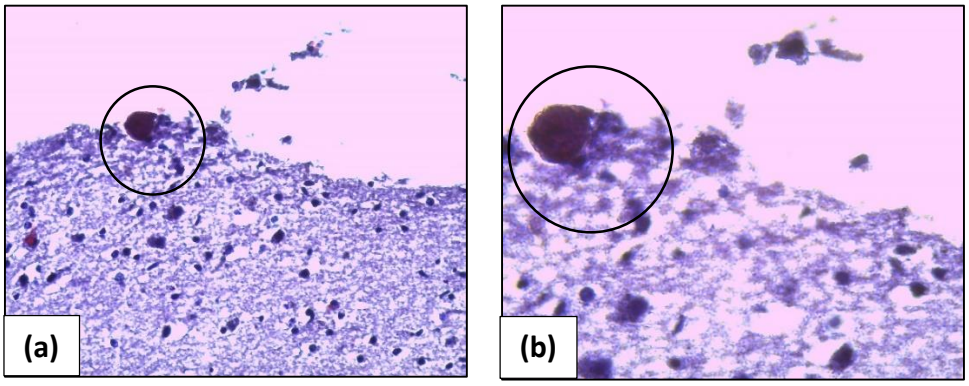


Figure 40 : Structure semblable à un kyste tissulaire de *N. caninum* dans le cerveau du fœtus n° 11 : (a) G à X 200, (b) G à X400 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

III.2.2.2.2. Lésions myocardiques

Au niveau du myocarde, nous avons noté la présence de structures similaires à des kystes tissulaires de *Neospora caninum* chez le fœtus n° 11***(Figure 41)*** et cœur du fœtus n° 5 ***(Figure 42).***

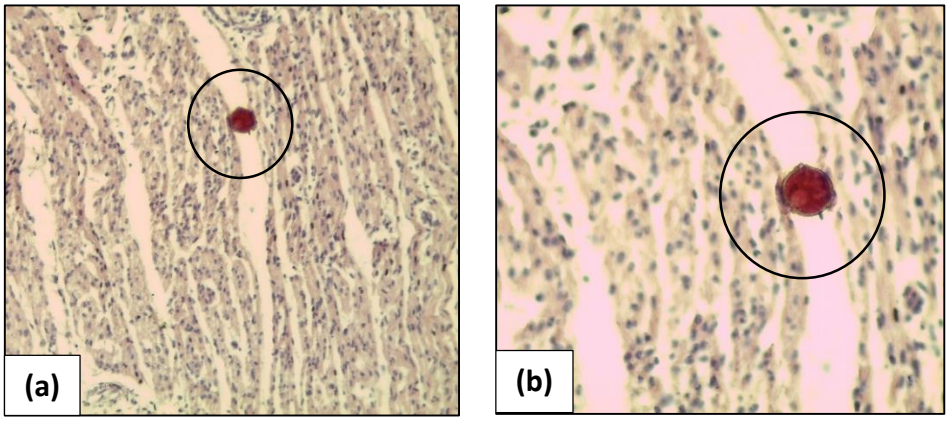


Figure 41 : Structure similaire à un kyste tissulaire de *N. caninum* dans le myocarde du fœtus n° 11 : (a) G à X 100, (b) G à X200 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

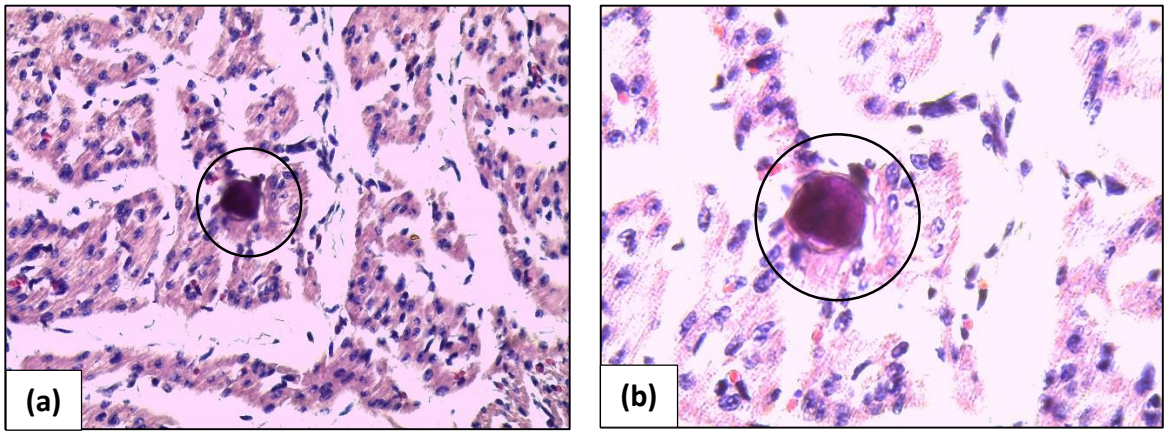


Figure 42 : Structure rappelant un kyste tissulaire de *Neospora caninum* dans le myocarde du fœtus n° 5 : (a) G à X 200, (b) G à X400 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

III.2.2.2.3. Lésions musculaires

Dans les muscles squelettiques, nous avons observé la présence de structures rappelant des kystes tissulaires de *Neospora caninum* au niveau du fœtus n° 5 ***(Figure 43)***, du fœtus n° 9 ***(Figure 44)*** et du fœtus n° 11 ***(Figure 45)***. Nous avons détecté la présence d'une myosite caractérisée par un foyer de nécrose et une infiltration par des cellules mononuclées au niveau du fœtus n °11 ***(Figure 46)***.

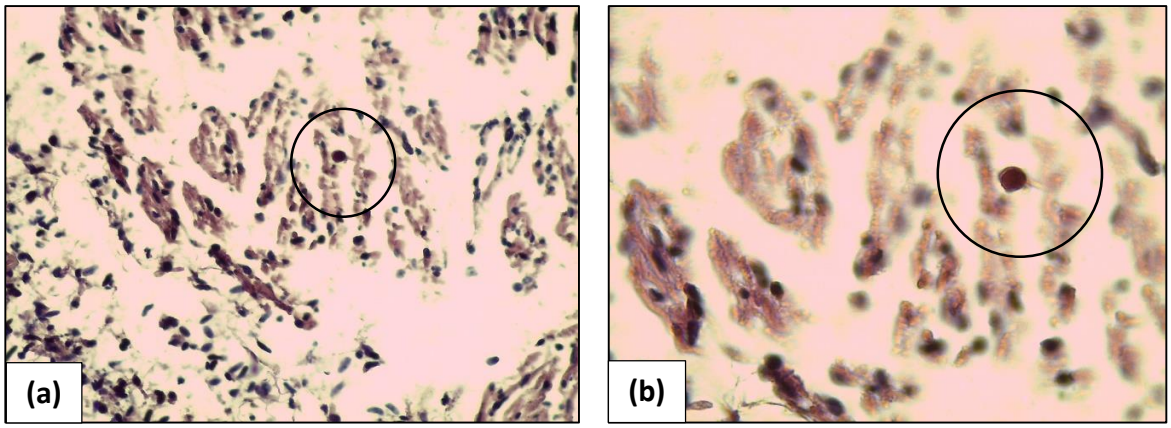


Figure 43 : Structure similaire à un kyste tissulaire de *Neospora caninum* dans le muscle squelettique du fœtus n° 5 : (a) G à X 200, (b) G à X400 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

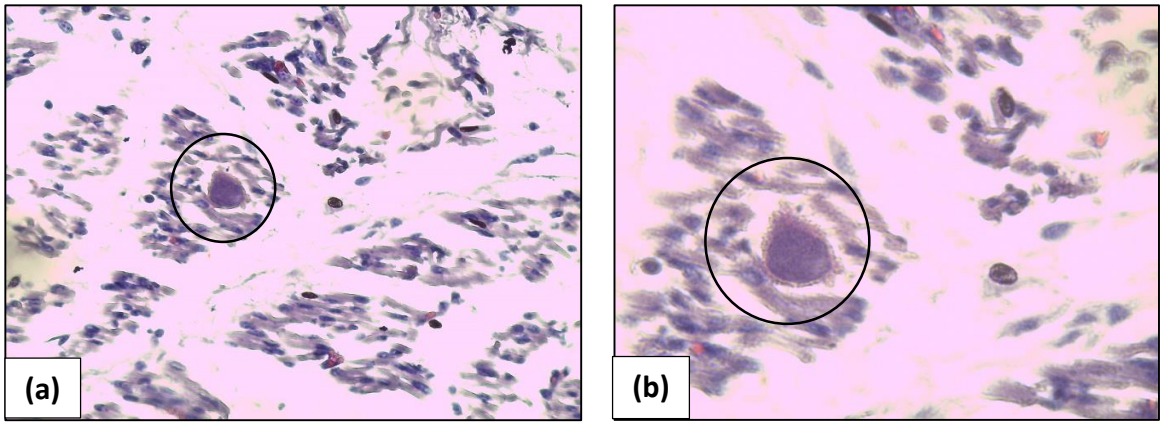


Figure 44 : Structure similaire à un kyste tissulaire de *Neospora caninum* dans le muscle squelettique du fœtus n° 9 : (a) G à X 200, (b) G à X 400 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

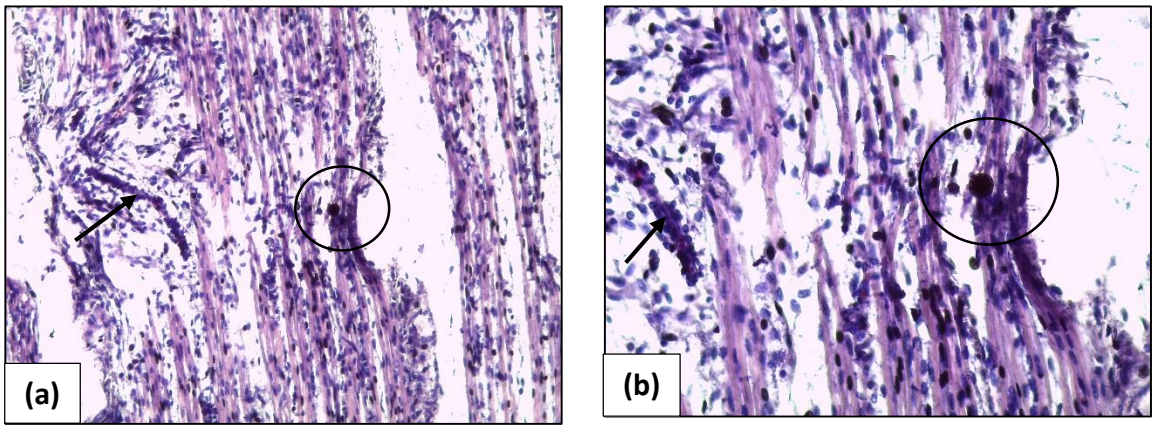


Figure 45 : Lésion inflammatoire avec infiltration par des cellules mononuclées*(Flèche)* et présence d'une structure semblable à un kyste tissulaire de *Neospora caninum* dans le muscle squelettique*(Cercle)* du fœtus n° 11 : (a) G à X100, (b) G à X 200 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

III.2.2.2.4. Lésions hépatiques

Enfin, au niveau du foie du fœtus n°2 nous avons observé la présence d'une structure morphologique très comparable à un kyste tissulaire associée à une infiltration par les cellules mononucléaires ***(Figure 46)***

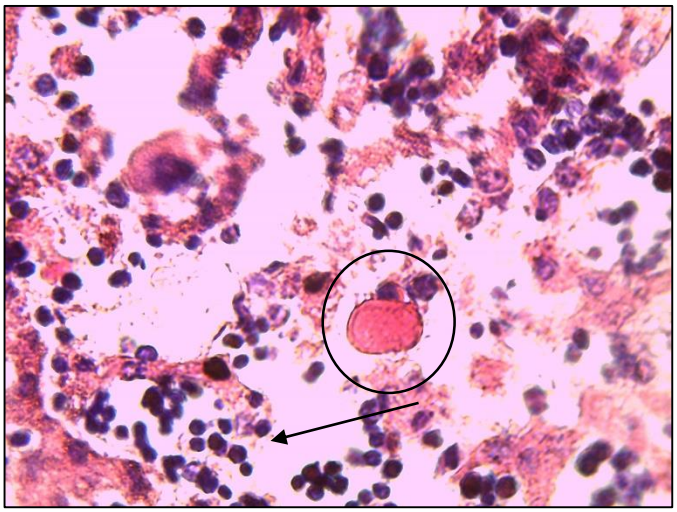


Figure 46 : Résultats histopathologiques du foie du fœtus n °2 : Structure semblable à un kyste tissulaire (Cercle) avec infiltration par des cellules mononucléaires, G à X400 (***PHOTOS PERSONNELLE, 2019)***

Les résultats ont confirmé la transmission verticale de *Neospora caninum* chez la vache de la race locale infectées naturellement du nord-est de l'Algérie.

IV. Discussion

N. caninum est un parasite Apicomplexa responsable de paralysie chez les chiens et d'avortements chez la vache. Des travaux antérieurs **(*GHALMI et al., 2011*)** avaient montré que *N. caninum* était une cause d'avortement chez la vache en Algérie mais que cet effet n'était pas de la même intensité en fonction du type de Bétail. En effet, chez les bovins laitiers modernes et améliorés, ils ont pu montrer une association entre la présence de *N. caninum* et les avortements alors que chez les bovins laitiers locaux, bien que la prévalence de *N. caninum* soit importante, il n'y avait pas d'association avec les avortements. Il semblait donc que la race bovine locale soit résistante à l'avortement causé pas *N. caninum* mais pas à la colonisation par le parasite. Ces observations constituaient le point de départ de notre travail. Le faible nombre de travaux de recherche s'intéressant à la race locale « Brune de l'Atlas » et la disponibilité des effectifs au niveau de notre région d'étude nous ont dicté le choix de cette race. La race locale « Brune de l'Atlas » renferme un potentiel génétique de rusticité avérée (adaptation aux faibles ressources alimentaires, résistance aux maladies et aux variations climatiques) et un potentiel de production non négligeable ***(AISSAOUI et al., 2003).*** L'échantillonnage s'est fait dans la région Nord Est Algérien. Cette région héberge plus de la moitié de l'effectif national en bovin local qui vit en extensif dans les montagnes et les forêts.

IV.1. Effectifs

Dans un premier temps, une étude séro-épidemiologique a été réalisée au niveau de 90 fermes différentes de race locale, avec des prélèvements de sang chez 650 vaches gestantes. Si on considère le nombre de bovin local étudié, notre effectif est d'un ordre de grandeur plus important que celui prélevé dans une étude antérieure (n=105) par ***GHALMI et al (2011)***, seule étude portant sur la race bovine locale algérienne. En Turquie, une étude sur la race bovine locale a eu lieu sur un effectif de 228 bovins ***(AKCA et al., 2005)***, quelques années plus tard une seconde étude a été réalisée chez la même race locale sur un échantillonnage de 132 bovins ***(KACAR et al., 2012).*** Quant à l'étude histopathologique, un total de 239 échantillons de tissus placentaires et fœtales ont été prélevés au niveau de l'abattoir de Souk-Ahras, au Nord-Est de l'Algérie. Les échantillons ont été prélevés sur 30 vaches locales gestantes et séropositive vis-à-vis de *N. caninum*.

IV.2. Tests utilisés

Le test ELISA est une méthode de dépistage sérologique simple, rapide et fiable présentant une sensibilité élevée et une grande spécificité. Il permet d'analyser un nombre important de

sérums en peu de temps. Cependant, la méthode Elisa présente l'inconvénient d'être coûteuse et exige un personnel qualifié pour sa réalisation. La sensibilité élevée de ce test pourrait révéler des faux positifs. Dans notre étude, le type d'ELISA indirect utilisé pour la détection des anticorps anti-*N. caninum* a une sensibilité de 99,6% et une spécificité de 97,3 %. Ce test ELISA de la firme IDVET a été validé. Il a fait l'objet de plusieurs études indépendantes dans la littérature ***(ALVAREZ-GARCÍA et al., 2013).*** Nous avons respecté toutes les précautions pour le bon déroulement du test. En effet, un mauvais prélèvement et/ou une mauvaise conservation des échantillons entre le terrain et le laboratoire se traduit par une hémolyse et les sérums obtenus seront de mauvaise qualité et inutilisables pour l'analyse ELISA ***(DOMBOU, 2008).***

IV.3. Étude Séro-épidemiologique

IV.3.1. Séroprévalence

N. caninum ne faisant pas l'objet d'une surveillance continue dans le monde, les données les plus courantes sont des données de prévalence. Les tests sérologiques restent les plus utilisés mais des données de PCR sont de plus en plus fréquemment citées. Ces deux techniques donnent des éclairages différents car elles mettent en évidence des choses très différentes. La séroprévalence chez le bovin varie en fonction du pays, de la région, de la taille des échantillons, des populations animales, de la gestion d'élevage, du contact avec les carnivores, du climat, du type de test sérologique utilisé et de la valeur utilisée comme seuil ***(DUBEY et al., 2007, GHALMI et al., 2007)***. Dans certains troupeaux laitiers, jusqu'à 88,8% de vaches se sont montrées séropositives à *N. caninum* (***MOORE, 2005 ; DUBEY et al., 2007)***. La séroprévalence a varié dans les six dernières années de 3,4% en Nigéria (***AYINMODE et al., 2017)*** à 41,2% en chine (***QIAN et al., 2017).*** Nous avons étudié la situation dans la région du Nord-Est algérien chez la vache de la race locale. Dans un premier temps, une étude de séroprévalence a été réalisée au niveau de 90 fermes en prélevant du sang chez 650 vaches gestantes. La séroprévalence individuelle observée a été de 36,2% (IC à 95 % : 32,7-39,8 %) (235/650). Elle est de même ordre que celui rapporté dans une étude antérieure (34,3%) chez la race bovine locale en Algérie ***GHALMI et al (2011).*** Une étude en Espagne sur la race Prim 'Holstein a rapporté une valeur similaire à la nôtre (36,8%) ***(QUINTANILLA-GOZALO et al., 1999)***. La séroprévalence observée dans notre étude est nettement plus élevée comparée avec celles obtenues dans d'autres régions de l'Algérie : elle était de 19,6 % (157/799 bovins laitiers importés, améliorés et locales) dans trois régions du Centre-Nord Algérien ***(GHALMI et al., 2011),*** 12,4% (23/186 bovins laitiers importés et améliorés) dans les régions du Centre-

Nord algérien ***(ACHOUR et al., 2012)*** et 16 % (23/145 vaches de Prim - Holstein) dans la région de Constantine ***(BOUAZIZ et al., 2013).*** Dans la région d'Alger, une séropositivité de 15 % (54/306 vaches de race importé et amélioré) a été obtenue dans une étude cas-témoins ***(DERDOUR et al. 2017).*** La séroprévalence retrouvée dans cette étude était plus élevée comparée aux autres séroprévalences signalées dans différents pays méditerranéens et africains. Elle était 2 % en Turquie ***(GÖKPINAR, 2021)***8,5 % au Maroc ***(LUCCHESE et al. 2016),*** 11 % en Italie ***(OTRANTO et al., 2003)*** 18,9 % en Égypte ***(FEREIG et al., 2016),*** 21.1% en sud de l'Italie ***(MANCA et al., 2022)***, 21,5 % en Tanzanie ***(SEMANGO et al., 2019)***. Ces séroprévalences peuvent ne pas être directement comparables en raison de différences méthodes sérologiques et valeurs seuils utilisées, ou des populations bovines différentes mais elles fournissent preuve de la distribution du parasite ***(DUBEY et al., 2007)***. Notre séroprévalence s'est montrée inférieure à celle obtenue au Sénégal par ***KAMGA-WALADJO et collaborateurs (2010)*** qui ont montré une exposition significativement plus élevée chez les vaches locales semi- transhumantes (71,4%), comparée à leurs congénères de races exotiques (17,4%) et métisses (27,3%) en stabulation. Par ailleurs, toujours dans la même région et la même étude, dans des troupeaux intensifs en stabulation permanente, la séroprévalence a été significativement plus élevée chez des vaches locales (53,3%) et métisses (25%) que chez les races exotiques (13,4%) **(*KAMGA-WALADJO et al. 2010)***. Cependant, dans une autre étude, une séroprévalence nulle a été rapportée. Cette étude a eu lieu dans la région de Kars, principale région d'élevage en Turquie, où aucune réponse d'anticorps spécifiques à *N. caninum* n'a été détectée chez 228 vaches de race locales ayant des antécédents d'avortement récents ***(AKCA et al., 2005).*** En revanche, chez les vaches de race Simmental, ils obtiennent une séroprévalence de 8.2%, démontrant une circulation du parasite dans la région ***(AKCA et al., 2005)***. Dans cette étude, la séroprévalence dans les fermes a varié de 0% à 100%. Sur les 90 fermes étudiées, 73 (81,11%) avaient au moins un animal séropositif vis-à-vis de *N. caninum* ; ceci suggère que ce parasite est distribué dans la plupart des fermes de race locale dans les régions étudiées. Ces taux de séroprévalences sont assez similaires à ceux publiés auparavant dans d'autres pays ***(DUBEY et al., 2007)***. Au Brésil, pratiquement la totalité des troupeaux étudiés était séropositive à *N. caninum* (93,3%) ***(CORBELLINI et al., 2006a).*** En Espagne, la séroprévalence du troupeau a été estimée à 80,6 % ***(EIRAS et al., 2011),*** et très récemment, une étude en Italie a montré que la présence d'une infection par *N. caninum* était confirmée dans 90,0 % (36/40) des 40 élevages analysés ***(MANCA et al., 2022)***. Cependant, des études montrant des valeurs inférieures ont été rapportés dans des régions d'Europe et de Canada ***(TREES et al., 1994 ; MCNAMEE et al., 1996 ; PARE et al., 1998 ; BARTELS et***

al., 1999 ; DAVISON et al., 1999b ; MAINAR-JAIME et al., 1999 ; OULD AMROUCHE et al., 1999 ; BJÖRKMAN et al., 2000, DUFFIELD et al., 2001 ; HOBSON et al., 2005 ; FRÖSSLING et al., 2005 ; BARTELS et al., 2006 ; CHANLUN et al., 2007). La comparaison directe des résultats doit se faire avec prudence car les études évoquées ont adopté des procédures différentes : des techniques différentes, des valeurs seuils différentes, des échantillons de taille différente ou encore des populations animales différentes. La séroprévalence élevée obtenue chez le bovin de race locale dans la région Nord-Est Algérien pourrait s'expliquer d'une part, par le système d'élevage pratiqué par les éleveurs du bovin local. En effet, les vaches locales sont élevées en mode de pâturage semi-extensif à extensif dans des zones difficiles (montagnes et forêts), ce qui laisse suggérer une transmission horizontale plus fréquente. La présence permanente de chiens errants et canidés sauvages, hôtes définitifs excréteurs d'oocystes de *N. caninum* concoure à la contamination des pâturages et des cours d'eau, source d'alimentation et d'abreuvage des animaux. De plus, les conditions climatiques de la région, sont en faveur d'une sporulation et survie des oocystes de *N. caninum.* Par ailleurs, le faible taux de renouvellement du cheptel, l'auto production des génisses de remplacement et l'utilisation des femelles locales fortement infectées pour la production de métisses peuvent justifier cette séroprévalence élevée vis-à-vis de *N. caninum* L'influence du mode d'élevage sur la séroprévalence de cette protozoose dans les troupeaux bovins a déjà été soulignée antérieurement (***BARTELS et al., 2006).***

IV.3.2. Étude cas-témoin : avortements et séropositivité à *N. caninum*

La néosporose est confirmée comme étant la principale cause d'avortement chez le bovin ***(MCALLISTER, 2006).*** Nous avons mené une étude cas-témoin pour déterminer l'association entre l'exposition à *N. caninum* et l'avortement**.** L'étude a concerné 90 fermes (30 fermes cas et 60 fermes témoins). Ceci correspond à un rapport de 1 cas/2 témoins. Cette étude visait à mettre en évidence un lien entre la présence d'anticorps dirigés contre *N. caninum* chez les vaches de race locale et les avortements. Dans cette étude, l'OR était de 0,9 (IC à 95% : 0,3-2,7) témoignant d'une absence de relation significative entre les vaches séropositives à *N. caninum* et les avortements observés. Dans le même objectif que le notre, des études cas-témoins ont été réalisées dans le monde pour estimer le rôle de *N. caninum* dans les avortements chez des vaches issus de populations différentes . Des valeurs de l'OR de 2,2 ***(ASMARE, 2014)***, 2,56 ***(DERDOUR et al., 2017)***, 3,36 ***(SANHUEZA et al., 2013)***,12,0 ***(GHALMI et al., 2011)*** à 22,1 (**SAGER et al 2001)** ont été observées. Ainsi, ***VACLAVEK et collaborateurs (2003)*** ont calculé un odds ratio de 7,6 et un X^2 de 17,4 ($p \leq 0,001$) montrant une association évidente entre la séroprévalence à *N. caninum* et les cas d'avortement. De

même dans l'étude de ***SAGER et collaborateurs (2001),*** une association significative a été obtenue entre la séropositivité à *N. caninum* et la présence d'avortement avec un *odds ratio* plus élevé de 22,1 et une valeur de X^2 de 40,75 ($p \leq 0{,}001$). En Grande Bretagne, ***DAVISON et collaborateurs (1999)*** ont obtenu dans une étude cas-témoins un *odds ratio* de 3,67 et un X^2 de 32. Enfin, ***DE MEERSCHMAN et collaborateurs (2000),*** en Belgique ont mené une étude cas-témoin comparant le statut sérologique vis-à-vis de *N. caninum* de vaches ayant avorté ou non. L'odds ratio estimé à partir des résultats IFAT était de 3,09, démontrant que les avortements en Belgique sont associés à la séropositivité vis-à-vis de *N. caninum.* Toutes ces études plaident pour un rôle majeur de *N. caninum* dans les cas d'avortement chez la vache. Or dans notre étude, le fait que la ferme héberge des animaux séropositifs n'est pas lié aux épisodes d'avortement observés dans ces fermes (pas de différence entre la séroprévalence dans les fermes cas et dans les fermes témoins). Cette absence d'association entre la séropositivité à *N. caninum* et la présence d'avortement était en contradiction avec de nombreux travaux précédents cité ci-dessus réalisés dans le monde y compris en Algérie, qui montrent que des vaches séropositives sont probablement plus à risque d'avorter que les vaches séronégatives ***(VACLAVEK et al., 2003; LOPEZ-GATIUS et al., 2004; GARCIA-VAZQUEZ et al., 2005; DUBEY et al., 2007; GONZÀLEZ-WARLETA et al., 2008; SIMSEK et al., 2008 ; MOORE et al., 2009; RETEROVA et al., 2009 ; GHALMI et al., 2011b ; ANSARI-LARI et al., 2017 ; DERDOUR et al., 2017 ; LLANO et al., 2018; KÖSE et al., 2021*)**.** En revanche, les résultats de notre étude cas-témoin vont dans le même sens que ceux obtenus par ***YILDIZ et al. (2009)***. En effet, ces derniers ont constaté que la séropositivité à *N. caninum* était presque deux fois plus élevée chez les vaches n'ayant pas avorté que ceux ayant avorté (6.83% vs 13.62%) ($p < 0.05$). Aussi, nos résultats sont en accord avec ceux de ***GHALMI et collaborateurs (2012)*** qui n'ont pas pu montrer d'association statistiquement significative entre la séropositivité à *N. caninum* et les avortements chez la race bovine locale. Au niveau individuel, nous avons constaté que l'OR était de 0,8 (IC à 95% : 0,6-1,2**)** ce qui n'était pas significativement différent de 1. Ce qui est encore une fois en faveur d'une non intervention de *N. caninum* dans l'avortement. Il ressort donc de cette étude cas témoins que les vaches gestantes de race locale sont fortement infectées par *N. caninum* mais en aucun cas on ne peut lier la présence d'avortement et cette forte séroprévalence. Ceci est à mettre en relation avec les résultats déjà obtenus en Algérie sur la race locale (***GHALMI et al., 2011b ; 2012***). Il semblerait encore une fois que les vaches de la race locale sont naturellement résistantes non pas à l'infection par *N. caninum* mais à son effet abortif.

IV.3.3. Étude des facteurs de risque

La connaissance des facteurs de risques susceptibles d'influencer positivement ou négativement la séroprévalence d'une maladie est nécessaire pour une bonne compréhension de son épidémiologie, ainsi que leurs implications en termes de stratégies de contrôle adaptées aux conditions locales. Plusieurs auteurs à travers le monde ont étudié les facteurs de risques associés à l'infection par *N. caninum*. La connaissance des facteurs de risque ainsi que l'association entre la présence du parasite et l'observation des avortements ont été importantes pour le développement et la mise en œuvre des mesures de contrôle de la néosporose bovine ***(DUBEY et al., 2007).*** Nos résultats ont révélé que la présence de chiens, la classe d'âge 84 mois et plus, la région de Jijel, la couleur blanche et grise, les conditions hygiène et le stade de gestation sont identifiés comme facteurs de risque de séropositivité pour *N. caninum*.

IV.3.3.1 Présence de chiens

Dans la présente étude l'OR est de 3,5 (IC à 95% : 2,5-5.1) ce qui montre que la présence de chiens est un facteur qui augmente le risque d'avoir des bovins séropositifs et appuie le fait épidémiologique que les chiens sont les principaux hôtes définitifs de *N. caninum.* Cela a été déjà décrit dans plusieurs études où la présence quasi permanente de chiens représente un facteur de risque majeur vis-à-vis de la séropositivité à *N. caninum* chez les bovins (***PARE et al. 1998***; ***OULD AMROUCHE et al., 1999*** ; ***MOORE et al., 2002 ; SANCHEZ et al., 2003*** ; ***VON BLUMRÖDER et al., 2006*** ; ***HOBSON et al., 2005*** ; ***CORBELLINI et al., 2006***, ***GHALMI et al., 2012*** , ***FÁVERO et al., 2017 ; SEMANGO et al., 2019 ; DE VELASCO-REYES et al., 2020 ; DE VENTUROSO et al., 2021).*** D'autres études ont également mis en évidence des associations positives entre la séropositivité à *N. caninum* chez le bovin et la présence, le nombre ou la densité des chiens des fermes ***(PARE et al., 1998 ; BARTELS et al., 1999 ; MAINAR-JAIME et al., 1999 ; OTRANTO et al., 2003 ; RINALDI et al., 2005 ; SCHARES et al., 2004 ; CORBELLINI et al., 2006).*** En revanche, des travaux déjà décrits ne montrent pas d'associations entre la présence de chiens et l'augmentation du risque d'exposition des bovins à *N. caninum* ***(RODRIGUEZ et al., 2002 ; KYAW et al., 2004 ; AGUIAR et al., 2006).*** Durant notre étude, nous avons pu constater que les chiens étaient en libre circulation dans toutes les zones d'élevage de bovin de la race locale, même dans les zones montagneuses. En effet, les chiens avaient accès libre et donc ils se nourrissaient de lait et des membranes placentaires en provenance de vaches qui mettaient bas ou avortaient. Il est aussi fort probable que les chiens défèquaient sur la nourriture stockée puisqu'ils n'étaient pas surveillés. Bien que la séroprévalence ait été plus faible dans les fermes dépourvues de chiens, le fait d'avoir trouvé une séroprévalence de 20,3 % peut impliquer d'autres sources d'infection

que les chiens. Rappelons que quasiment toutes les vaches de la race locale sont élevées en mode de pâturage semi extensif dans des zones difficiles (montagnes et forêts) avec présence de canidés sauvages, hôtes définitifs excréteurs d'oocystes de *N. caninum* concourent à la contamination des pâturages et des cours d'eau, source d'alimentation et d'abreuvage des animaux. Aussi la transmission verticale est un important mode d'infection qui contribue significativement à la persistance de l'infection à *N.caninum* dans le troupeau ***(SANCHEZ et al., 2003 ; MANCA et al., 2022)***.

IV.3.3.2. Avortement

Si on considère la séroprévalence chez les vaches ayant avorté (37,30%), on remarque qu'elle est assez similaire à celle obtenue chez les vaches n'ayant pas avorté (36,0%). Ce qui montre clairement qu'il n'y a pas d'association entre la séroprévalence et le fait que la vache ait avorté ou non. Par conséquent, il est supposé que *N. caninum* n'est sans doute pas la cause de cet avortement. Ces résultats corroborent avec ceux précédemment publiés sur la race locale en Algérie qui n'ont pas montré de différences significatives entre les séroprévalences des deux groupes de vaches (***GHALMI et al., 2012). GINDRI et al., (2018)*** **et** ***MOURA et al. (2012)*** ont démontré l'absence d'une association significative entre les prévalences plus élevées vis-à-vis de N. *caninum* chez les animaux atteints de troubles de la reproduction (avortement, repeat breeding, …). En revanche, ils sont en contradiction avec de nombreux autres travaux qui vont dans le sens d'une relation étroite entre la séropositivité d'une vache et l'augmentation de la probabilité d'avorter ***(THURMOND et HIEATALA, 1997 ; GOTTSTEIN et al., 1998 ; WOUDA, 2000 ; OSAWA et al., 2002 ; VACLAVEK et al., 2003; KASHIWAZAKI et al., 2004 ; HALL et al., 2005 ; DUBEY et al., 2006. REITT et al., 2007; MOORE, 2009*** **; BECK** ***et al., 2010 ;*** **NEMATOLLAHI** ***et al., 2011 ; ASMARE et al., 2013 ; KLAUCK et al., 2016 ; FÁVERO et al., 2017 ; GHAREKHANI et YAKHCHALI, 2019; DE SOUZA et al., 2022).***

IV.3.3.3. Age

Nos résultats montrent que la séroprévalence augmentait avec l'âge. Les animaux plus âgés (84 mois et plus) présentaient une séroprévalence plus élevée comparé aux plus jeunes comme l'a évoqué ***DIJKSTRA et collaborateurs (2002)***. Cela suggère que la transmission horizontale dans cette population était plus répandue que la transmission verticale. Cela peut être dû à une augmentation des risques d'exposition aux oocystes sporulés dans l'environnement et que le temps d'exposition à cette source de contamination, est plus grande. Ceci est en accord

avec certaines études qui ont mis en évidence des différences significatives en fonction de l'âge, avec une séroprévalence plus élevée chez les animaux de plus de 24 mois ***(JENSEN et al., 1999 ; DYER et al., 2000 ; ROMERO et al., 2002 ; GUIMARES et al., 2004; RINALDI et al., 2005 ; RAZMI et al., 2006 ; ARMENGOL et al., 2007, ROMERO-SALAS et al., 2010 ; NAZIR et al., 2013 ; DE SOUZA et al., 2022).*** Alors que d'autres études n'ont pu mettre en évidence aucun effet significatif de l'âge sur la séroprévalence (***PARE et al., 1996 ; DAVISON et al., 1999a ; PITEL et al., 2001 ; OTRANTO et al., 2003; KYAW et al., 2004 ; KOIWAI et al., 2006 ; PABON et al., 2007 ; IBRAHIM et al., 2012). SANDERSON et al., (2000)*** ont rapporté que les vaches de moins de 3 ans avaient des titres d'anticorps anti-*N. caninum* plus élevés que les vaches de plus de 6 ans. En effet, dans le cas d'une transmission verticale, on ne s'attend pas à avoir une augmentation de la séroprévalence avec l'âge alors que s'il s'agit d'une transmission horizontale, la séroprévalence augmenterait avec l'âge des bovins.

IV.3.3.4. Parité

Les résultats obtenus sur ce facteur font apparaitre une association significative entre la séroprévalence et la multiparité alors que pour les vaches nullipares et primipares aucune association n'a pu être mise en évidence. Ceci est en accord avec certaines études ayant obtenu les mêmes résultats ***(ALMERIA et al, 2009 ; LOPEZ-GATIUS et al 2004 ; ASMARE et al 2013 ; KAMALI et al., 2014 ; FAVERO et al., 2017 ; KLAUCK et al., 2016 ; SNAK et al., 2018).*** Au Brésil ***(ROMERO-SALAS et al, 2010)*** ont montré une corrélation positive entre la parité et la séroprévalence des vaches. Cette dernière était plus importante chez les multipares que chez les nullipares. En revanvhe, ***DE SOUZA et al., 2022*** n'ont rapporté aucune différence en fonction de la parité. Comme évoqué ci-dessus, la transmission horizontale dans la population étudiée semblait plus fréquente. Cela est dû probablement à une augmentation des risques d'exposition aux oocystes sporulés dans l'environnement, conséquence de l'infection ***(DUBEY et al., 2007).***

IV.3.3.5. Couleur de la robe

La couleur de la robe est pour la première fois étudiée comme éventuelle facteur de risque. Il existe en effet, une différence significative entre la séropositivité et la couleur des poils chez les bovins locaux. Les vaches avec robes grises et blanches ont tendance à être plus vulnérables à l'acquisition de l'infection. Ces résultats doivent être interprétés avec prudence car la majorité des vaches de la région de Jijel sont grises et blanches. La relation entre la

séropositivité à *N. caninum* en fonction de la région s'est révélée positive. La séroprévalence la plus élevée a été retrouvée dans la région de Jijel (55,1%). L'élevage de vaches dans cette région existe dans un système extensif au niveau des montagnes et des forêts où les chiens, les canidés sauvages et les vaches vivent ensemble au même endroit, ce qui facilite la transmission horizontale du parasite.

IV. 3.3.6. Stade de gestation

Une différence dans la séroprévalence en fonction du stade de gestation a été observée. En effet, les résultats ont montré que les vaches en début de gestation (1-3 mois) sont moins souvent séropositives (22,6%) que les vaches gestantes à des stades plus tardifs (≥4 mois) (39,45%). Ceci est probablement due à une réinfection ou à la réactivation d'une infection chronique. Ainsi, le parasite, enkysté dans les tissus de la vache après une infection initiale, va se réactiver (passage du stade bradyzoïte au stade tachyzoïte) et stimuler le système immunitaire, ce qui entrainerait au cours de la gestation une production d'anticorps spécifiques ***(CONRAD et al., 1993 ; JENKINS et al., 1997*** ; ***STENLUND et al., 1999*** ; ***MALEY et al., 2001*** ; ***MORE et al., 2009*** ; ***GHALMI et al., 2012).*** De nombreuses études ont montré que la plupart des bovins qui ont transmis *N. caninum* à leur descendance avait une augmentation marquée des anticorps anti-*N. caninum* pendant la gestation ***(CONRAD et al., 1993 ; PARE et al., 1997 ; STENLUND et al., 1999 ; GUY et al., 2001).*** A contrario, ***GUY et collaborateurs (2001)*** ont constaté que les vaches qui n'ont pas transmis l'infection verticalement aux veaux n'ont pas eu une augmentation marquée des anticorps anti *N. caninum* durant la gestation. Des fluctuations dans les titres en anticorps ont été observées durant la gestation chez des vaches infectées chroniquement ***(NOGAREDA et al., 2007).*** En effet à partir de la mi- gestation une augmentation des titres d'anticorps a été détectée ***(DANNATT et al., 1995 ; STENLUND et al., 1999 ; QUINTANILLA-GOZALO et al., 2000 ; TREES et al., 2002 ; ANDRIANARIVO et al., 2005 ; KAMALI et al., 2014 ; DE SOUZA et al., 2022***).

IV.3.3.7. État d'hygiène des fermes

Les résultats relatifs à l'état d'hygiène de la ferme mettent en évidence que plus l'hygiène de la ferme est bonne plus le taux de séroprévalence est faible. Inversement quand l'hygiène est mauvaise ou moyenne, le taux de séroprévalence est important. Un nettoyage adéquat dans les fermes réduit le risque de contamination des aliments et de l'eau par des oocystes, ce qui minimise le risque de néosporose. Or les conditions d'hygiène faibles favorisent le contact entre les matières fécales des chiens (riche en oocystes) et les bovins, mais aussi le contact les

chiens avec les avortons, placentas ou d'autres matériaux infectieux. Cette observation corrobore les résultats obtenus par ***GHAMI et collaborateurs (2012)*** et par ***DE SOUZA et al., 2022.*** Des conditions d'hygiène inadéquates peuvent également entraîner d'autres maladies infectieuses, entraînant des altérations de la reproduction des vaches. Le virus de la diarrhée virale bovine (BVD) et le virus de l'herpès bovin sont associés à l'infection à *N. caninum* chez les bovins ***(RINALDI et al., 2007 ; OLMO et al., 2019),*** ce qui souligne l'importance d'une gestion sanitaire adéquate pour éviter les pertes de reproduction.

IV.3.3.8. Région

Nous avons montré que la séroprévalence vis-à-vis de *N. caninum* était significativement différente en fonction de la région. La séroprévalence est plus importante au niveau de la région de Jijel qu'au niveau des autres régions étudiées. En effet, la séroprévalence chez les bovins peut varier largement en fonction des pays, des régions et de la localisation géographique. Des travaux ont montré des variations en fonction de la région géographique au sein du même pays notamment en Suède ***(FRÖSSLING et al., 2008),*** en Thaïlande ***(SUTEERAPARP et al., 1999 ; KASHIWAZAKI et al., 2001 ; CHANLUN et al., 2002 ; 2006 ; 2007)***, en Iran ***(SADREBAZZAZ et al., 2004 ; HAJI HAJIKOLAEI et al., 2008, SALEHI et al., 2010 ; SATTARI et al., 2011 ; GHAREKHANI et al., 2012 ; 2014 ; HOSSEININEJAD et al., 2017 ; NOUROLLAHI FARD et al., 2017 ; ANSARI-LARI, 2020)*** et même en Algérie ***(GHALMI et al., 2011 ; ACHOUR et al., 2012 ; BOUAZIZ et al., 2013 ; DERDOUR et al. 2017).*** Les différences régionales dans les séroprévalences peuvent avoir de multiples causes comme la présence plus importante des chiens et des canidés sauvages ou la plus grande densité de fermes qui peuvent favoriser la contamination horizontale. De plus, les facteurs climatiques comme les précipitations et la température semblent influencer la sporulation et la survie des oocystes de *N. caninum* ***(SCHARES et al., 2004 ; RINALDI et al., 2005).***

IV.3.3.9. Saison

Nos résultats font apparaitre une séroprévalence significativement plus faible en été et plus élevée au printemps. Si on met cela en relation avec les facteurs climatiques, il est à signaler, que les températures ambiantes ainsi qu'une bonne humidité, ont été décrites comme étant optimales pour la sporulation des oocystes ***(BARLING et al., 2001 ; GONDIM et al., 2002 ; RINALDI et al., 2005 ; DUBEY et al., 2007)*** alors que la température de 4°C semble inhiber la sporulation ***(SCHARES et al., 2003***). En effet, une sporulation meilleure et rapide des

oocystes dans l'environnement de l'animal serait plus efficace à la bonne saison (printemps) alors que celle-ci diminue si la température diminue (automne) ou si la température augmente avec diminution d'humidité (été). Le printemps est aussi la saison des vêlages et donc aussi des avortements ce qui augmente la charge infectieuse, et permet au cycle de *N. caninum* de se dérouler efficacement avec au final une infection des bovins plus importante. Cette saisonnalité de l'infection a été confirmé dans plusieurs études ***(BARLING et al., 2001 ; RINALDI et al., 2005 ; KAMALI et al., 2014).***

IV.4. Etude histopathologique

La présence des anticorps spécifiques dans les sérums de vaches est seulement indicative de l'exposition a *N. caninum* ***(DUBEY, 1999).*** L'étude cas témoins sur des vaches gestantes de race locale fortement infectées a montré que les vaches de la race locale sont naturellement résistantes non pas à l'infection par *N. caninum* mais à son effet abortif. L'examen des fœtus s'impose pour confirmer la transmission transversale de *N. caninum* des mères séropositives au fœtus et pour un diagnostic définitif de la néosporose fœtale. Nous nous sommes donc attachés à la collecte et à l'examen de fœtus bovins. Dans la présente étude nous avons récupéré 30 fœtus issus de 30 vaches séropositives. En pratique, la méthode principale pour diagnostiquer l'infection à *N. caninum* chez l'avorton est l'examen histopathologique des tissus fœtaux suivie par l'identification spécifique du parasite dans les lésions tissulaires par ImmunoHistoChimie ***(ANDERSON et al., 1991*** ; ***DUBEY et LINDSAY, 1993*** ; ***WOUDA et al., 1997*** ; ***NEMATOLLAHI et al., 2003*** ; ***KAMALI et al., 2014)***. 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., 1997).*** La détection de lésions compatibles avec *N. caninum* par examen histologique et du parasite par PCR dans le cerveau, le cœur ou le foie de l'avorton représente la meilleure approche pour le diagnostic sur l'avorton ***(ORTEGA-MORA et al., 2006).*** Dans la présente étude nous avons utilisé uniquement l'analyse histopathologique. En effet, la technique IHC, reste une méthode qui nécessite des moyens financiers considérables. Dans notre travail, l'examen histopathologique a été considéré comme technique de référence, conformément à d'autres travaux déjà publiés ***(BASZLER et al., 1999 ; SAGER et al., 2001 ; MEDINA et al., 2005. NEMATOLLAHI et al.,2013*** ; ***FILHO et al., 2017)***. Les organes prélevés étaient, le cerveau, le cœur et le foie, organes les plus fréquemment affectés en cas de néosporose bovine

(WOUDA et al., 1997a ; DUBEY, 2003 ; GEORGIEVA et al., 2006) mais, la rate, les poumons, les muscle squelettiques, les reins et les cotylédons placentaires ont aussi été prélevés. Parmi les 30 fœtus bovins étudiés, 6 se sont montrés positifs à l'histopathologie. Nous avons constaté que le cerveau, avec le muscle squelettique étaient les organes les plus touchés par le parasite (3/6). Cette constatation supporte les travaux qui ont montré que le cerveau fœtal était le tissu le plus affecté en cas de néosporose ***(ANDERSON et al., 1991 ; NIETFIELD et al., 1992 ; HELMAN et al., 1998 ; DUBEY, 2003 ; CORBELLINI et al., 2006 ; COLLANTES-FERNANDEZ et al., 2006*** ; ***ALMERIA et al., 2010 ; ELSHEIKHA et al., 2013 ; NEMATOLLAHI et al., 2013 ; PEREIRA et al., 2014 ; ALMERIA et al., 2016).*** Les sections des 3 cerveaux positifs ont permis de mettre en évidence la présence de lésions compatibles avec l'infection par *N. caninum*. Nous avons noté sur l'une des coupes, une encéphalite non suppurative caractérisée par une infiltration de cellules mononuclées autour d'une aire centrale de nécrose. Il s'agit bien d'une lésion caractéristique de la néosporose située dans le système nerveux central. Cette lésion liée à la néosporose a fait l'objet de plusieurs publications ***(BARR et al.,1990 ; 1991 ; ANDERSON et al., 1994 ; HELMAN et al., 1998 ; SLAPETA et al., 2003 ; DUBEY et SCHARES, 2006 ; DUBEY et al., 2006 ; PESCADOR et al. 2007 ; NISHIMURA et al., 2013a, NEMATOLLAHI et al., 2013 ; UTEU et al. 2013 ; SÁNCHEZ et al., 2013 ; KAMALI et al., 2014 ; DONAHOE et al., 2015).*** La multiplication des tachyzoïte à l'intérieur des cellules nerveuses provoque des lésions caractérisées par une inflammation non-suppurée associée à des foyers de nécrose ***(DUBEY, 1999b).*** De façon intéressante, nous avons identifié sur deux coupes différentes de cerveaux, une structure morphologique très comparable à un kyste tissulaire à bradyzoïte. Elle était plus volumineuse à paroi épaisse et plus complexe, dépourvu de cloison (septum) qui semblait correspondre à des stades avancés de l'infection ***(JARDINE, 1996)***. Les kystes tissulaires à bradyzoïte observés dans les échantillons de cerveau des fœtus étaient similaires à ceux rapportés dans la littérature lors des infections par *N. caninum* (***DUBEY et al., 2006 ; ZHANG et al. 2007*** ; ***MORENO et al., 2012 ; NISHIMURA et al., 2013 ; DONAHOE et al., 2015).*** Selon ***GUINO (2005)*** les kystes sont rarement observés dans le système nerveux de l'avorton mais s'ils sont présents, ils sont faciles à observer. Dans cette étude, des lésions microscopiques ont été aussi observées au niveau des muscles squelettiques. Ils se caractérisent par une myosite avec un foyer de nécrose et une infiltration par des cellules mononucléaires et par la présence de structures rappelant des kystes tissulaires de *Neospora caninum*. L'existence de ce genre de lésions musculaires est fréquente chez les avortons bovins et chez les fœtus bovins infectés expérimentalement par *Neospora caninum* ***(DUBEY***

et al., 1989 ; MORALES et al., 2001 ; PETERS et al., 2001. GONDIM et al., 2002 ; ORTEGA-MORA et al., 2006, ZHANG et al. 2007 ; ***PESCADOR et al., 2007 ; NAKAGAKI et al., 2016 ; COSTA et al., 2021).*** Les kystes tissulaires sont plus susceptibles de se former dans le système nerveux central plutôt que dans d'autres tissus ***(DUBEY et al., 1988, 1990).*** Bien que ***PETERS et al. (2001)*** ont signalé des kystes tissulaires à paroi épaisse dans des muscles de bovins et de chiens naturellement infectés, nous avons aussi observé des kystes musculaires avec une épaisseur de la paroi identique à celle rapportée précédemment par ***PETERS et al. (2001).*** La présence de kystes à bradyzoïte de *N. caninum* dans les muscles squelettiques de l'hôte intermédiaire signifie que l'avorton représente une source de contamination facile pour l'HD (facilement consommés) contrairement au SNC qui est protégé par le crâne osseux et les vertèbres. Au niveau du myocarde, nous avons noté la présence de structures similaires à des kystes tissulaires de *Neospora caninum* chez deux fœtus**.** Des lésions du myocarde sévères (myocardite extensive et nécrose des myocytes) ont déjà été décrites dans plusieurs publications ***(YAEGER et al. 1994*** ; ***JARDINE, J.E. et LAST, R.D. 1995*** ; ***DUBEY et LINDSAY, 1996 ; HELMAN et al., 1998 ; LINDSAY et al., 1999 ; CORBELLINI et al., 2002 ; DUBEY, 2003 ; ORTEGA-MORA et al., 2006 ; ZHANG et al. 2007. SANTOS et al., 2011 ; FOSTER, 2017 ; AL-SHAELI et al.,2020).*** Dans notre étude, aucune lésion myocardique n'a été détectée. Une étude de ***DUBEY et al. (1999)*** rapporte que la cause de la mort des fœtus avortés est l'insuffisance cardiaque causée par des lésions myocardiques étendues et sévères. Enfin, au niveau du foie et du placenta, les analyses montrent qu'il s'agit d'organes les mois fréquemment touchés. Au niveau du foie, l'examen histopathologique révèle un foyer inflammatoire riche en cellules mononuclées avec présence d'une structure morphologique très comparable à un kyste tissulaire. Les lésions trouvées au niveau du foie étaient similaires à celles décrites auparavant dans la littérature ***(BARR et al., 1990 ; JARDINE et LAST, 1995 ; WOUDA et al., 1997 ; GONDIM et al., 2002 ; ZHANG et al. 2007. SANTOS et al., 2011 ; DONAHOE et al., 2015 ; FOSTER, 2017 ; MAHAJAN et al., 2019 ; AL-SHAELI et al.,2020). BARR et al., (1990) et WOUDA et al., (1997)*** rapportent que des lésions d'hépatites sont plus nombreuses lors d'épizootie d'avortements dans un élevage par rapport à des élevages où les avortements sont sporadiques. Les lésions placentaires sont plutôt rares, toutefois sur le cotylédon placentaire, nous avons observé une structure tissulaire semblable à un kyste à bradyzoïte. Dans les conditions expérimentales ou naturelles, les lésions inflammatoires touchent d'abord les cotylédons pour gagner ensuite l'ensemble de l'allantochorion. En parallèle, le parasite passe dans le système sanguin du fœtus envahissant préférentiellement son système nerveux ***(BUXTON et al., 2002).*** Les

lésions de placentite et de nécrose du mésenchyme et du trophoblaste fœtal sont d'autant plus graves que le nombre de tachyzoïtes est élevé ***(MACALDOWIE et al., 2004 ; DUBEY et SCHARES, 2006).*** Les tissus maternaux et fœtaux sont tous deux atteints par *Neospora caninum*. Les fœtus présentaient des lésions histopathologiques plus bénignes, mais davantage de kystes parasitaires. Ces résultats pourrait s'expliquer par le fait que les tachyzoïtes se différencier en bradyzoïte qui s'enkyste dans les tissus. Cette transformation est très probablement initiée en réponse à la réaction immunitaire du fœtus. Les kystes tissulaires à bradyzoïtes peuvent d'ailleurs persister très longtemps dans les tissus ***(LINDSAY et al., 1992)*** et constituent le réservoir pour l'hôte définitif ***(GONDIM et al., 2002).*** Chez les bovins infectés par *N. caninum*, les cellules de la rate et du foie du fœtus sont capables de répondre à une stimulation mitogène au environ du jour 100 de la gestation mais ne sont pas capables de produire de réponse humorale ou cellulaire spécifiques il faut attendre 130 jours de gestation pour voir apparaître cette réponse spécifique ***(INNES et al., 2005).*** Au fur et à mesure que la gestation progresse, la capacité du fœtus à développer une réponse immunitaire contre le parasite augmente ***(GHALMI, 2011).*** L'absence de résultats positifs dans les autres fragments analysés n'exclut pas la possibilité d'une présence parasitaire. Selon ***PINTO et al. (2012),*** l'absence de tachyzoïte ou de kystes de *N. caninum* dans les tissus présentant des lésions typiques de ce protozoaire peut survenir en raison de sa distribution sporadique et clairsemée dans les tissus. Cependant, l'examen de coupes histologiques permet d'établir un diagnostic de suspicion, pourtant les lésions ne sont pas pathognomoniques et le recours à l'immunohistochimie est indispensable pour confirmer la présence de *Neospora caninum.* Un diagnostic différentiel avec *Toxoplasma gondii* et *Sarcocystis spp* doit être réalisé ***(DUBEY and LINDSAY, 1996).*** Des méthodes d'examens plus poussées, comme l'immunohistochimie et l'amplification génique (PCR) permettent de différentier *Neospora caninum* des autres protozoaires ***(JENKINS et al., 2002).*** Bien que la transmission verticale de *N. caninum* se produise chez les bovins dans cette région d'Algérie, l'infection n'a pas causé de lésions fœtales et placentaires étendues et sévères. Les résultats obtenus dans l'étude histopathologie ne font que renforcer encore une fois les résultats de l'étude séro-épidemiologie précédente. Ceci est à mettre en relation avec les résultats déjà obtenus en Algérie sur la race locale (***GHALMI et al., 2011b ; 2012***). Les vaches de la race locale sont naturellement résistantes non pas à l'infection par *N. caninum* mais à son effet abortif.

V. Conclusion et recommandations

A l'heure actuelle, *N. caninum*, est reconnu comme étant une cause majeure d'avortement chez les bovins partout dans le monde. Notre étude constitue la première sur l'infection par *N. caninum* chez la population bovine locale « brune Atlas » dans le Nord-Est de l'Algérie. Sur le plan individuel, la séropositivité obtenue vis-à-vis de ce parasite était de l'ordre 36.2%. Les Facteurs de risque pouvant favoriser potentiellement une infection par *N. caninum* incluaient la présence de chiens, l'âge, la région, la couleur de la robe, l'hygiène de la ferme ou encore le stade de gestation. La transmission horizontale de *N. caninum* représente probablement le mode d'infection le plus important dans la région Nord-Est Algérien. La présence de chiens s'est montrée un facteur de risque d'avoir des bovins séropositifs. Ceci n'est pas surprenant puisque le chien est l'hôte définitif, source d'oocystes. Par ailleurs, les vaches peuvent représenter des sources possibles d'infection pour les chiens à travers leur consommation de placentas et/ou d'avortons bovins. Par conséquent, il est important de prendre des mesures préventives pour réduire le risque d'infection des bovins par transmission horizontale.

Le problème de la transmission verticale d'une vache à son veau reste posé. Un programme de contrôle basé sur la diminution de cette voie de transmission est indispensable. Parmi les éléments importants à envisager, prévenir par exemple certains facteurs potentiels qui seraient en faveur d'une recrudescence de la maladie chez les vaches infectées congénitalement.

Notre étude cas-témoins n'a montré aucune relation entre l'infection à *N. caninum* et l'avortement. Bien que la transmission verticale de *N. caninum* soit aussi courante chez le bovin local, l'infection présente chez le fœtus n'a pas été responsable de lésions fœtales et placentaires importantes. L'analyse histopathologique, même si elle n'a pas été suivie par la technique d'immunohistochimie, semble appuyer les résultats séro-épidemiologiques obtenus. Les avortements survenant dans les fermes étudiées ne semblent pas être attribuables à *N. caninum*. Ce constat renforce celui observé dans une autre étude réalisée en Algérie qui émet une hypothèse sur la résistante des bovins de population locale aux avortements induits par *N. caninum*.

La confirmation que les vaches locales ne soient pas sensibles à la néosporose peut se faire, d'une part, par une étude cas-témoin plus large en premier et d'autre part, si nos résultats sont confirmés, procéder à des études moléculaires pour mettre en évidence la base génétique de

cette résistance. Cette étude repose sur l'identification du ou des gènes impliqués et des mécanismes sous-jacents. Il serait alors intéressant d'introduire ce caractère par croisement avec d'autres races existantes en Algérie, sensibles aux avortements par *Neospora caninum*. Il serait aussi intéressant d'exporter ce caractère sous forme de semence de taureaux ou d'embryons congelés.

Enfin, dans le cadre du diagnostic différentiel, il serait intéressant de pouvoir développer chez l'avorton, un test de PCR multiplex permettant de détecter en une même réaction toutes les causes infectieuses possibles d'avortement chez la vache.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

ABDELTIF B., 2014. Etude de l'impact de *Neospora caninum* comme agent abortif chez la vache gestante de la race locale dans la région de Jijel. Thèse de Magister en sciences vétérinaire, ENSV, El Harrach-Alger, 133p.

ACHOUR K., BEN MAHDI MH, AKKOU M. TENIOU X.R., 2012 .Séroprévalence de *Neospora caninu*m dans les élevages bovins laitiers de la région centre nord de l'Algérie. *Rev. Sci. Technol. Int. Epiz. Rev. Sci. Technol. Int. Epiz,* 31(3): 953-958.

ADJOGBLE KD, MERCIER C, DUBREMETZ JF, HUCKE C., MACKENZIE CR, CESBRON- DELAUW MF, DAUBENER W, **2004**. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes.

AGUADO-MARTINEZ A, ALVAREZ-GARCIA G, FERNANDEZ-GARCIA A, RISCO-CASTILLO V, ARNAIZ-SECO I, REBORDOSA-TRIGUEROS X, NAVARRO-LOZANO V, ORTEGA-MORA LM, 2008. Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. Vet Parasitol, 157,182-195.

AGUADO-MARTINEZ A, ALVAREZ-GARCIA G, ARNAIZ-SECO I, INNES E, ORTEGA-MORA LM, 2005 . Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, *17*(5), 442-450.

AGUADO-MARTINEZ A, ALVAREZ-GARCIA G, FERNANDEZ-GARCIA A, RISCO-CASTILLO V, ARNAIZ-SECO I, REBORDOSA-TRIGUEROS X, NAVARRO-LOZANO V, ORTEGA-MORA LM, 2008. Usefulness of rNcGRA7 and rNcSAG4 based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 157**,** 182-95.

AGUIAR DM, CAVALCANTE GT, RODRIGUES AA, LABRUNA MB, CAMARGO L M, CAMARGO EP, GENNARI SM, 2006 . Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Vet. Parasitol.*, 142, 71-7.

AKCA A, GOKCE HI, GUY CS, MCGARRY JW, WILLIAMS DJ, 2005. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in local and imported cattle breeds in the Kars province of Turkey. Res. Vet. Sci.,78, 123-126.

AKTAS M, SAKI CE, ALTAY K, SIMSEK S, UTUK AE, KÖROGLU E, DUMANLI N, **2005**. Survey of *Neospora caninum* in cattle in some provinces in the Eastern Anatolian region. *Turkiye. Parazitol. Derg.*, 22-25.

ALMERIA S, LOPEZ-GATIUS F, 2015. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. *Res Vet Sci*, 100, 169-175.

ALMERÍA S, ARAUJO R, TUO W, LOPEZ-GATIUS F, DUBEY JP, GASBARRE LC, **2010.** Foetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. Vet. Parasitol. 169, 304–311.

ALMERIA S, DE MAREZ T, DAWSON H, ARAUJO R, DUBEY JP, GASBARRE LC 2003. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. Paras Immunol., 25, 383-392.

ALMERIA S, LOPEZ-GATIUS F, GARCIA-ISPIERTO I, NOGAREDA C, BECH-SABAT G, SERRANO B, SANTOLARIA P, YANIZ JL, 2009. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. *Vet Parasitol*, 163, 323-329.

ALMERÍA S, SERRANO-PEREZ B, DARWICH L, DOMINGO M, MUR-NOVALES R, REGIDOR-CERRILLO J, CABEZÓN O, PÉREZ-MAILLO M, LOPEZ-HELGUERA I, FERNÁNDEZ-AGUILAR X, PUIG RIBAS M, ORTEGA-MORA LM, GARCÍA-ISPIERTO I, DUBEY JP, LÓPEZ GATIUS F, 2016. Foetal death in naïve heifers inoculated with *Neospora caninum* isolate Nc-Spain7 at 110 days of pregnancy, *Experimental Parasitology*, *168*, 62-69.

AL-QASSAB SE, REICHEL MP, ELLIS JT, 2010. On the Biological and Genetic Diversity in Neospora caninum. Diversity 2, 411.

AL-SHAELI SJJ, ETHAEB AM, GHARBAN HAJ, 2020. Molecular and histopathological identification of ovine neosporosis (*Neospora caninum*) in aborted ewes in Iraq, *Veterinary World*, 13(3): 597-603.

ALVAREZ-GARCIA G, COLLANTES-FERNANDEZ E, COSTAS E, REBORDOSA X., ORTEGA-MORA LM, 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. Vet Res, 34, 341-352.

ALVAREZ-GARCIA G, GARCIA-CULEBRAS A, GUTIERREZ-EXPOSITO D, NAVARRO-LOZANO V, PASTOR-FERNANDEZ I, ORTEGA-MORA LM, 2013. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet Parasitol*, 198, 85-95.

ALVAREZ-GARCIA G, PEREIRA-BUENO J, GOMEZ-BAUTISTA M, ORTEGA-MORA LM, 2002. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoïte antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted foetuses. *Vet Parasitol*, 107, 15-27.

ALVAREZ-GARCIA G, PITARCH A, ZABALLOS A, FERNANDEZ-GARCIA A, GIL C, GOMEZBAUTISTA M, AGUADO-MARTINEZ A, ORTEGA-MORA LM, 2007. The NcGRA7 gene encodes the immunodominant 17 kDa antigen of *Neospora caninum*. *Parasitology.*, 134**,** 41-50.

ÁLVAREZ-GARCIA G, GARCIA-CULEBRAS A, GUTIERREZ- EXPOSITO D, NAVARRO-LOZANO V, PASTOR-FERNANDEZ I, ORTEGA-MORA LM, 2013. Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet. Parasitol*., 198(1-2): 85-95.

ANDERSON ML, BLANCHARD PC, BARR BC, DUBEY JP, HOFFMAN RL, CONRAD PA, 1991. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Med.Assoc.,* 198, 41- 44.

ANDERSON ML, REYNOLDS JP, ROWE JD, SVERLOW KW, PACKHAM AE, BARR BC, CONRAD P A 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* spp. Infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 210, 1169-1172.

ANDERSON ML, ANDRIANARIVO AG, CONRAD PA, 2000. Neosporosis in cattle. Anim. Reprod. Sci., 60-61, 417-431.

ANDERSON ML, BARR BC, CONRAD P, 1994. Protozoal causes of reproductive failure in domestics ruminants. Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract., 10(3), 439-461.

ANDREOTTI R, MATOS MDE F, GONCALVES KN, OSHIRO LM, LIMA-JUNIOR MS, PAIVA F, LEITE FL, 2009. Comparison of indirect ELISA based on recombinant protein NcSRS2 and IFAT for detection of *Neospora caninum* antibodies in sheep. *Rev Bras Parasitol Vet*, 18, 19-22.

ANDRIANARIVO AG, ANDERSON ML, ROWE JD, GARDNER IA, REYNOLDS JP, CHOROMANSKI L, CONRAD PA, 2005. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitol. Res.*, 96, 24-31.

ANDRIANARIVO AG, BARR BC, ANDERSON ML, ROWE JD, PACKHAM AE, SVERLOW KW, CONRAD PA, 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, **87**, 817-825.

ANIMAL GENETIC RESOURCES (ANGR), 2003. Rapport National sur les Ressources Génétique Animales. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Algérie , 46p.

Available at <http://www.fao.org/3/a1250e/annexes/CountryReports/Algeria.pdf>. Acqcessed on 17 August 2020.

ANSARI-LARI M, 2020. Bovine neosporosis in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Preventive veterinary medicine*, *176*, 104913.

ANSARI-LARI M, ROWSHAN-GHASRODASHTI A, JESMANI H, MASOUDIAN M, BADKOOBEH M, 2017. Association of *Neospora caninum* with reproductive performance in dairy cows: A prospective study from Iran. Veterinary research forum : an international quarterly journal, 8(2), 109–114.

ANTONY A, WILLIAMSON NB, 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, *51*(5), 232-237.

ARMENGOL R, PABON M, SANTOLARIA P, CABEZON O, ADELANTADO C, YANIZ J, LOPEZGATIUS F, ALMERIA S, 2007. Low seroprevalence of *Neospora caninum* infection associated with the limousine breed in cow-calf herds in Andorra, Europe. *J. Parasitol.*, 93, 1029-32.

ASMARE K, REGASSAB F, ROBERTSONC LJ, SKJERVEC E, 2013. Seroprevalence of Neospora caninum and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. Vet. Parasitol. 193, 85-94.

ASMARE K, 2014. *Neospora caninum* versus *Brucella* spp. Exposure among dairy cattle in Ethiopia: A case-control study. *Trop. Anim. Health Prod*., 46(6): 961-699.

ASMAREA K, REGASSAB F, ROBERTSONC LJ, SKJERVEC E, 2013b. Seroprevalence of Neospora caninum and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. Vet. Parasitol., 193, 85-94.

ASSIM, 1989. Association des enseignants d'immunologie de langue francaise. Immunologie generale. MEDSI: Paris, , 329 p.

ATKINSON RA, RYCE C, MILLER CM, BALU S, HARPER PA, ELLIS JT, 2001. Isolation of Neospora caninum genes detected during a chronic murine infection. Int J Parasitol, 31, 67-71.

AYINMODE A, AKINSEYE V, SCHARES G, AND CADMUS S, 2017. Serological survey of toxoplasmosis, neosporosis and brucellosis among cattle herds in Oyo State, south-western Nigeria. African Journal of Infectious Diseases, 11, 95–101.

B

BAILLARGEON P, FECTEAU G, PARE J, LAMOTHE P, SAUVE R, 2001. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 218, 1803-1806.

BARBER J, TREES AJ, OWEN M, TENNANT B, 1993. Isolation of *Neospora caninum* from a British dog. Vet Rec 133, 531-532.

BARBER JS, TREES AJ, 1998. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. International journal for parasitology 28, 57-64.

BARLING KS, MCNEILL JW, PASCHAL JC, MCCOLLUM III FT, CRAIG TM, ADAMS LG, THOMPSON JA, 2001. Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. Preventive Veterinary Medicine. Nov 2;52(1):53-61.

BARR BC, ANDERSON ML, BLANCHARD PC, DAFT BM, KINDE H, CONRAD PA 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.*, 27, 354-61.

BARR BC, CONRAD PA, DUBEY JP, ANDERSON ML, 1991. *Neospora* -like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. J Vet Diagn Invest 3, 39-46.

BARTELS CJ, ARNAIZ-SECO JI, RUIZ-SANTA-QUITERA A, BJORKMAN C, FROSSLING J, VON BLUMRODER D, CONRATHS FJ, SCHARES G, VAN MAANEN C, WOUDA W, ORTEGA-MORA LM, 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol*., 137, 17-27.

BARTELS CJ, VAN MAANEN C, VAN DER MEULEN AM, DIJKSTRA T, WOUDA W, 2005. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodiesto *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet Parasitol*, 131, 235-246.

BARTELS CJ, WOUDA W, SCHUKKEN YH, 1999. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, *52*(2), 247-257.

BARTELS CJM, ARNAIZ-SECO JI, RUIZ-SANTA-QUITERA A, BJÖRKMAN C, FRÖSSLING J, VON BLUMRÖDER D, CONRATHS FJ, SCHARES G, VAN MAANEN

C, WOUDA W, ORTEGA-MORA LM, 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. Vet. Parasitol.,137,17-27.

BARTELS, CJM, WOUDA W, SCHUKKEN YH, 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). Theriogenology 52:247–257.

BARTLEY P. M 2016. Host-parasite interactions of *Neospora caninum*. Thèse de doctorat Université d'Edinburgh, p264.

BARTLEY PM, KIRVAR E, WRIGHT S, SWALES C, ESTEBAN-REDONDO I, BUXTON D, MALEY SW, SCHOCK A, RAE AG, HAMILTON C, INNES EA, 2004. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J Comp Pathol*, 130, 81-91.

BASSO W, SCHARES S, MINKE L, BARWALD A, MAKSIMOV A, PETERS M, SCHULZE C, MULLER M, CONRATHS FJ, SCHARES G. 2010. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum* associated bovine abortion. *Vet Parasitol*, 173, 24-31.

BASSO WL, VENTURINI MC, VENTURINI P, MOORE M, RAMBEAU JM, UNZAGA C, CAMPERO D, BACIGALUPE, DUBEY JP, 2001. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. J. Parasitol. 87**:**906–907.

BASSO W, VENTURINI L, VENTURINI MC, HILL DE, KWOK OC, SHEN SK, DUBEY JP, 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology, 87*(3), 612-618.

BASZLER V, ADAMS S, VANDER-SCHALIE J, MATHISON BA, KOSTOVIC M, 2001. Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3851-3857.

BASZLER TV, GAY LJ, LONG MT, MATHISON BA, **1999**. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J.Clin.Microbiol.*, 37, 4059-4064.

BASZLER TV, KNOWLES DP, DUBEY JP, GAY JM, MATHISON BA, MCELWAIN TF, 1996. Serological diagnosis of bovine neosporosis by Neospora caninum monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol, 34, 1423-1428.

BECK R, MARINCULIĆ A, MIHALJEVIĆ Ž, BENIĆ M, MARTNKOVIĆ F, 2010. seroprevalence and potential risk factors of Neospora caninum infection in dairy cattle in Croatia. Vet. Arhiv., 80(2) 163-171.

BENAVIDES J, COLLANTES-FERNANDEZ E, FERRE I, PEREZ V, CAMPERO C, MOTA R, INNES E, ORTEGA-MORA LM, 2014. Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what is known and what is needed. *Parasitology*, 141, 1471-1488.

BENAVIDES J, KATZER F, MALEY SW, BARTLEY PM, CANTON G, PALAREA-ALBALADEJO J, PURSLOW CA, PANG Y, ROCCHI MS, CHIANINI F, BUXTON D, INNES EA, 2012. High rate of transplacental infection and transmission of *Neospora caninum* following experimental challenge of cattle at day 210 of gestation. *Vet Res*, 43, 83.

BENCHAAR C,1987. contribution à l'étude de l'élevage bovin locale dans la région d'Annaba. Mémoire d'Ing. Agr., I.N.A., El Harrach-Alger.

BENYAROU M, 2016. Contribution à la l'étude des caractéristiques laits de bovin locale dans la région de Tlemcen. Mémoire de Master en génétique, Université de Tlemcen Abou Bekr BelKaid, Tlemcen, 89p.

BERGERON N, FECTEAU G, VILLENEUVE A, GIRARD C, PARE J, **2001**. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol*, 97**,** 145–152.

BIELANSKI A, ROBINSON J, PHIPPS-TODD B, 2002. Effect of *Neospora caninum* on *in vitro* development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. *Vet Rec*, 150, 316-318.

BJERKAS I, MOHN SF, PRESTHUS J, 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd, 70**,** 271-4.

BJERKAS I, PRESTHUS J, 1989. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. APMIS 97, 459-468.

BJORKMAN C, ALVAREZ-GARCIA G, CONRATHS FJ, MATTSSON JG, ORTEGA-MORA LM, SAGER H, SCHARES G, 2006. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. *Vet Parasitol*, 140, 273-280.

BJORKMAN C, GONDIM LF, NASLUND K, TREES AJ, MCALLISTER MM, 2005. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. *Vet Parasitol*, 128, 195-200.

BJORKMAN C, JOHANSSON O, STENLUND S, HOLMDAHL OJM, and UGGLA A 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association, 208,1441-1444.

BJORKMAN C, LUNDEN A, HOLMDAHL J, BARBER J, TREES AJ, UGGLA A, 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an ISCOM antigen. *Parasite Immunol*, 16, 643-648.

BJORKMAN C, ALENIUS S, MANUELSSON U, UGGLA A, 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet J*, 159, 201-206.

BJÖRKMAN C, GONDIM LF, NASLUND K, TREES AJ , MCALLISTER MM, 2005. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. *Vet. Parasitol.*, 128, 195-200.

BJÖRKMAN C., HOLMDAHL O. J., UGGLA A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.* , 68**,**251-260.

BJÖRKMAN C, LUNDEN A, 1998. Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of *Neospora* and *Toxoplasma* infections. *Int. J. Parasitol*., 1998, 28,187-193.

BJÖRKMAN C, LUNDEN A, HOLMDAHL J, BARBER J, TREES AJ, UGGLA A, 1994. *Neospora caninum* in dogs : detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite. Immunol.*, 1994, 16, 643-648.

BJÖRKMAN C, UGGLA A, 1999. Serological diagnosis of *Nesopora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.*, **29**,1497-1507.

BNEDER 1978. Diagnostic de la situation actuelle du cheptel de la race. Rapport N°2.Bouchaoui, Chéraga .Alger.

BOGER LA, HATTEL AL, 2003. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. Vet Parasitol, 113, 1-6.

BOHNE W, HEESEMANN J, GROSS U, 1994. Reduced replication of Toxoplasma gondii is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. Infection and Immunity 62, 1761-1767.

BORSUK S, ANDREOTTI R, LEITE FP, PINTO LDA S, SIMIONATTO S, HARTLEBEN CP, GOETZE M, OSHIRO LM, MATOS MDE F, BERNE ME, 2011. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. *Vet Parasitol*, 177, 33-38.

BOUAZIZ O, DIB AL, AIMEUR R, LAKHDARA N, BOUAZIZ A, BRERHI E, 2013. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Eastern Algeria. *Ann. Biol. Res*., 4(11): 76-77.

BOULAHBEL JM., 1999. Essai de caractérisation biométrique de la race bovine locale Type : Cheurfa. Thèse de magister. Université de Annaba.

BOURAS H., 2015. Contribution *à la* connaissance des systèmes d'élevage bovin. *dans la* région d'Ouargla. Agronomie : Parcours et Elevages en Zones Arides. Ouargla: Université Kasdi Merbah.

BOUZEBDA-AFRI F, 2007. Performances zootechniques et structurale d'élevage dans la population bovin de type local (Est algérien). Thèse doc. d'Etat en sciences vétérinaires. Faculté sciences de la nature et la vie université de Constantine, 123p.

BRUGERE-PICOUX J, ADLER CL, CHASTANT S, MILLEMANN Y, REMY D, 1998. La néosporose bovine : une cause majeure d'avortement ? Bull. Soc. Vét. Prati. France, **82**(4),177-201.

BRYAN LA, GAJADHAR AA, DUBEY JP, HAINES DM, 1994. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora sp*. protozoan. *Can. Vet. J.* , 35, 111-3.

BUTLER JE. 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Vet Immunol Immunopathol*, 4, 43-152.

BUXTON D, MALEY SW, WRIGHT S, THOMSON KM, RAE AG, INNES EA, **1998**. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. J Comp Pathol, 118,267-279.

BUXTON D, WRIGHT S, MALEY SW, RAE AG, LUNDEN A, INNES EA, 2001. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. Parasite Immunol, 23, 85-91.

BUXTON D, 1998. Protozoan infections (Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Sarcocystis spp.) in sheep and goats: recent advances. Veterinary Research, 29, 289-310.

BUXTON D, MCALLISTER MM, DUBEY JP, 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends Parasitol, 18:546–552.

BUXTON D, MALEY SW, THOMSON KM, TREES AJ, INNES EA, 1997. Experimental infection of nonpregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J. Comp. Pathol.*, **117**, 1-16.

BUXTON D, MALEY SW, WRIGHT S, THOMSON KM, RAE AG, INNES EA, 1998. The pathogenesis ofexperimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.*, 118, 267-279.

C

CAETANO-DA-SILVA A, FERRE I, ADURIZ G, ALVAREZGARCIA G, DEL-POZO I, ATXAERANDIO R, REGIDORCERRILLO J, UGARTEGARAGALZA C, ORTEGAMORA LM, 2004. *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. Vet. Parasitol., 124, 19-24.

CAFFARO CE, KOSHY AA, LIU L, ZEINER GM, HIRSCHBERG CB, BOOTHROYD JC. 2013. A nucleotide sugar transporter involved in glycosylation of the *Toxoplasma* tissue cyst wall is required for efficient persistence of bradyzoites. PLoS Pathog, 9, 1-10.

CAMPERO CM, MOORE DP, LAGOMARSINO H, ODEON AC, CASTRO M, VISCA H, 2003. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. *J Vet Med B* *50*(9), 458-460.

CAMPERO LM, VENTURINI MC, MOORE DP, MASSOLA L, LAGOMARSINO H, GARCIA B, BACIGALUPE D, RAMBEAUD M, PARDINI L, LEUNDA MR, SCHARES G, CAMPERO CM, 2015. Isolation and molecular characterization of a new Neospora caninum isolate from cattle in Argentina. Exp Parasitol, 155, 8-12.

CANTONG J, KATZER F, MALEY SW, BARTLEY PM, BENAVIDESSILVAN J, PALAREA-ALBALADEJO J, PANG Y, SMITH SH, ROCCHI MS, BUXTON D, INNES EA, CHIANINI F. **2014b**. Inflammatory infiltration into placentas of Neospora caninum challenged cattle correlates with clinical outcome of pregnancy. Vet Res, 45**,** 11.

CANTON GJ, KATZER F, MALEY SW, BARTLEY PM, BENAVIDESSILVAN J, PALAREA-ALBALADEJO J, PANG Y, SMITH SH, ROCCHI M, BUXTON D, INNES EA, CHIANINI F, **2014a**. Cytokine expression in the placenta of pregnant cattle after inoculation with Neospora caninum. Vet Immunol Immunopathol, 161**,** 77-89.

CAPELLI G, NARDELLI S, DI REGALBONO AF, SCALA A, PIETROBELLI M, 2004. Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. *Vet. Parasitol.*, 123,143-148.

CAPELLI G, NATALE A, NARDELLI S, FRANGIPANE DI, REGALBONO A, PIETROBELLI M, 2006. Validation of a commercially available cELISA test for canine neosporosis against an indirect fluorescent antibody test (IFAT). *Prev. Vet. Med*., 73, 315-320.

CARRUTHERS VB, TOMLEY FM, 2008. Microneme proteins in apicomplexans. Subcell Biochem, 47, 33-45.

CAVALCANTE GT, MONTEIRO RM, SOARES RM, NISHI SM, ALVES NETO AF, ESMERINI PDE O, SERCUNDES MK, MARTINS J, GENNARI SM, 2011. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. *Vet Parasitol*, 179, 220-223.

CAVALCANTE GT, SOARES RM, NISHI SM, HAGEN SCF, VANNUCCHI CI, MAIORKA PC, et al. 2012. Experimental infection with *Neospora caninum* in pregnant bitches. Rev Bras Parasitol Vet; 21(3): 232-236.

CHAHAN B, GATURAGA I, HUANG X, LIAO M, FUKUMOTO S, HIRATA H, NISHIKAWA Y, SUZUKI H, SUGIMOTO C, NAGASAWA H, FUJISAKI K, IGARASHI I, MIKAMI T, XUAN X., 2003. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1. *Vet Parasitol*, 118, 177-185.

CHANLUN A, EMANUELSON U, CHANLUN S, AIUMLAMAI S, BJÖRKMAN C, 2006. Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. *Vet.Parasitol.*, 136**,** 243-50.

CHANLUN A, EMANUELSON U, FRÖSSLING J, AIUMLAMAI S, BJÖRKMAN C, **2007**. longitudinal study of seroprevalence and seroconversion of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in northeast Thailand. *Vet.Parasitol.*, 31**,** 242-8.

CHANLUN A, NASLUND K, AIUMLAMAI S, BJÖRKMAN C, 2002. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Vet. Parasitol.*, 110, 35-44.

COLE RA, LINDSAY DS, DUBEY JP, BLAGBURN BL, 1993. Detection of *Neospora caninum* in tissue sections using a murine monoclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 579-84.

COLE RA, LINDSAY DS, DUBEY JP, TOIVIO-KINNUCAN MA, BLAGBURN BL, **1994**. Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum tachyzoïte*s by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Am. J. Vet. Res.*, 55**,** 1717-22.

COLLANTES-FERNA´NDEZ E, RODRI´GUEZ-BERTOS A, ARNA´IZ-SECO I, MORENO B, ADURIZ G, ORTEGA-MORA LM, 2006. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. Theriogenology 65, 629–641.

COLLANTES-FERNANDEZ E, ZABALLOS A, ALVAREZ-GARCIA G, ORTEGA-MORA LM, 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. J Clin Microbiol. 40(4):1194-8.

CONRAD PA, BARR BC, SVERLOW KW, ANDERSON M, DAFT B, KINDE H, DUBEY JP, MUNSON L, ARDANS A, 1993. In vitro isolation and characterization of a Neospora sp. from aborted bovine foetuses. Parasitology. 1993 Apr;106(3):239-49.

CONRAD PA, SVERLOW K, ANDERSON M, ROWE J, BONDURANT R, TUTER G, BREITMEYER R, PALMER C, THURMOND M, ARDANS A, 1993. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J.Vet.Diagn.Invest.*, **5**, 572-578.

CORBELLINI LG, DRIEMEIER D, CRUZ CF, GONDIM LF, WALD V. 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Veterinary Parasitology, v. 103, n. 3, p. 195-202.

CORBELLINI LG, SMITH DR, PESCADOR CA, SCHMITZ M, CORREA A, STEFFEN DJ, DRIEMEIER D, 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. Prev. Vet. Med. 74**:**130–141.

COSTA KS, SANTOS SL, UZEDA RS, PINHEIRO AM, ALMEIDA MA, ARAUJO FR, MCALLISTER MM, GONDIM LF, 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 38, 157-159.

COSTA LSDA, PENA HFJ, WITHOEFT JA, CRISTO TG, DE MELO IC, OLIVEIRA S, MOURA AB, CASAGRANDE RA, 2021. Abortion Due to Neospora caninum in Dairy Cattle in Southern Santa Catarina State, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, *49*.

D

DANNATT L, GUY F, TREES AJ, 1995. Abortion due to Neospora species in a dairy herd. *Vet. Rec.*, **137,**566-7.

DAVISON HC, OTTER A, TREES AJ, 1999a. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy.

DAVISON HC, FRENCH NP, TREES AJ, 1999b. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet.Rec.*, , 144, 547-550.

DAVISON HC, OTTER A, TREES AJ, **1999c.** Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol.*, 29, 1189- 1194.

DAVISON HC, GUY CS, MAC GARRY JW, GUY S, WILLIAMS DJL, KELLY DF, TREES AJ, 2001. Experimental studies of the transmission of *Neospora caninum* between cattle. Research in veterinary Science, 70, 163-168.

DE AQUINO DINIZ LV, MINUTTI AF, DE SOUZA LIMA NINO B, COSTA LR, BOSCULO MRM, DE ALMEIDA BFM, GARCIA JL, DE BARROS LD., 2019. Vertical transmission of *Neospora caninum* in bovine fetuses from a slaughterhouse in Brazil. Trop Anim Health Prod.51(6):1751-1755.

DE MAREZ T, LIDDELL S, DUBEY JP, JENKINS MC, GASBARRE L, 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. Int. J. Parasitol., 29, 1647-1657.

DE MEERSCHMAN F, LOSSON B. *Neospora caninum* et la néosporose : biologie et description des lésions chez le chien. *Ann. Méd. Vet.*, 1998, **142**, 847-853.

DE MEERSCHMAN F, SPEYBROECK N, BERKVENS D, RETTIGNERA C, FOCANT C, LECLIPTEUX T, CASSART D, LOSSON B, 2002. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology*, 58, 933-945.

DE MEERSCHMAN F, FOCANT C, BOREUX R, LECLIPTEUX T, LOSSON B, 2000. Cattle neosporosis in Belgium : a case-control study in dairy and beef cattle. *Int. J. Parasitol*. 30, 887-890.

DE MEERSCHMAN F., LOSSON B. 1998b. *Neospora caninum* : un nouvel agent abortif chez le bovin et autres espèces domestiques. An. Méd. Vét**.,** **142,** 299-305.

DE MEERSCHMAN F, SPEYBROECK N, BERKVENS D, RETTIGNER AC, FOCANT C, LECLIPTEUX T, CASSART D, LOSSON B, 2002. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology.*, 58, 933-945.

DE SOUZA GG, AMATTI LZ, GARCIA LV, COSTA, LR, MINUTTI AF, MARTINS T A, BOGADO A, IGNACIO FS, DE ALMEIDA B, GARCIA JL, DE BARROS LD, 2022. *Neospora caninum* infection and reproductive problems in dairy cows from Brazil: A case-control study. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, *28*, 100683.

DE VELASCO-REYES I, CRUZ-VÁZQUEZ C, MEDINA-ESPARZA L, VITELA-MENDOZA I, ÁNGEL-SAHAGÚN CA, GÓMEZ-LEYVA JF, 2020. Prevalence, Incidence, and Risk Factors for Infection by Neospora caninum in Dairy Farm Dogs in North-Central Mexico. *The Journal of parasitology*, *106*(2), 312–315.

DE VENTUROSO PJS, VENTUROSO OJ, SILVA GG, MAIA MO, WITTER R, AGUIAR DM, DE PACHECO RC, FERREIRA E, DA COSTA AJ, DOS SANTOS-DONI TR, 2021. Risk factor analysis associated with *Neospora caninum* in dairy cattle in Western Brazilian Amazon. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 30, e023020

DERDOUR, SY, HAFSI F, AZZAG N, TENNAH S, AAMARI A, CHINA B, GHALMI F, 2017. Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria. Journal of Veterinary Research,61, 337–343.

DIJKSTRA T, BARKEMA HW, EYSKER M, WOUDA W, 2001. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. Int. J. Parasitol. 31**:**209–215.

DIJKSTRA T, BARKEMA HW, HESSELINK JW, WOUDA W, 2002. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. Vet. Parasitol. 105:89–98.

DIJKSTRA T, EYSKER M, SCHARES G, CONRATHS FJ, WOUDA W, BARKEMA HW, 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum's spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. Int. J. Parasitol., 31, 747–752.

DOMBOU E, 2008. Séroprévalence de la néosporose (*Neospora caninum*) chez quelques espèces animales du Parc Forestier et Zoologique de Hann (Sénégal). Thèse Med vet. E.I.S.M.V., 80.

DONAHOE SL, LINDSAY SA, KROCKENBERGER M, PHALEN D, SLAPETA J, 2015. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. Int J Parasitol Parasites Wildl 4, 216-238.

DOWSE T, SOLDATI D, 2004. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. Curr Opin Microbiol, 7, 388-396.

DUBEY JP, 1999. Recent advances in *Neospor*a and neosporosis. *Vet. Parasitol*., 84, 349-367.

DUBEY JP, BUXTON D, WOUDA W, **2006.** Pathogenesis of bovine neosporosis. J. Comp. Pathol ., 134, 267-289.

DUBEY JP, JENKINS MC, ADAMS DS, MCALLISTER MM, ANDERSON-SPRECHER R, BASZLER TV, KWOK OC, LALLY NC, BJÖRKMAN C, UGGLA A, 1997. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Parasitol.*, 83, 1063-9.

DUBEY JP, LINDSAY DS, ADAMS DS, GAY JM, BASZLER TV, BLAGBURN BL, THULLIEZ P, 1996b. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.*, , **57,** 329-336.

DUBEY JP, LINDSAY DS, **1993.** Neosporosis. Parasitology Today,9(12), 452-458.

DUBEY JP, 1999a. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. J Am.Vet Med Assoc., 214**,** 1160-1163.

DUBEY JP, 1999b. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Veterinary parasitology 84, 349-367.

DUBEY JP, 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol 41, 1-16.

DUBEY JP, BARR BC, BARTA JR, BJERKAS I, BJORKMAN C, BLAGBURN BL, BOWMAN DD, BUXTON D, ELLIS JT, GOTTSTEIN B, HEMPHILL A, HILL DE, HOWE DK, JENKINS MC, KOBAYASHI Y, KOUDELA B, MARSH AE, MATTSSON JG, MCALLISTER MM, MODRY D, OMATA Y, SIBLEY LD, SPEER, CA, TREES AJ, UGGLA A, UPTON SJ, WILLIAMS DJ, LINDSAY DS, 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. International journal for parasitology 32, 929-946.

DUBEY JP, BUXTON D, WOUDA W, 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Pathol 134, 267-289.

DUBEY JP, CARPENTER JL, SPEER CA, TOPPER MJ, UGGLA A, 1988a. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 192, 9, 1269-1285.

DUBEY JP, HATTEL AL, LINDSAY DS, TOPPER MJ, 1988b. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193, 10, 1259-1263.

DUBEY JP, HEMPHILL A, CALERO-BERNAL R, SCHARES G, 2017. Neosporosis in animals, 1st edition. CRC Press, Boca Raton, USA, 548 pp.

DUBEY JP, JENKINS MC, RAJENDRAN C, MISKA K, FERREIRA LR, MARTINS J, KWOK OC, CHOUDHARY S, 2011. Gray wolf (Canis lupus) is a natural definitive host for Neospora caninum. Veterinary parasitology 181, 382-387.

DUBEY JP, LINDSAY DS, 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Veterinary parasitology 67, 1-59.

DUBEY JP, SCHARES G, 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol*, 140,1-34.

DUBEY JP, SCHARES G, 2011. Neosporosis in animals-the last five years. Vet Parasitol 180, 90-108.

DUBEY JP, SCHARES G, ORTEGA-MORA LM, 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev, 20, 323-367.

DUBEY JP, ZARNKE R, THOMAS NJ, WONG SK, VAN BONN W, BRIGGS M, DAVIS JW, EWING R, MENSE M, KWOK OC, ROMAND , 2003. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. Vet. Parasitol. Oct 30;116(4):275-96.

DUBEY JP, CARPENTER JL, SPEER CA, TOPPER MJ, UGGLA A., 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 192, 1269–1285.

DUBEY JP, KOESTNER A, PIPER RC, 1990. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 857–860.

DUBEY JP, LINDSAY DS, TOPPER MJ, 1990b. *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2(1): 66-69.

DUBEY JP, SCHARES G, ORTEGA-MORA LM, 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev*., 20(2): 323-367.

DUFFIELD TF, PEREGRINE AS, MCEWEN BJ, HIETALA SK, BAGG R, DICK P, 2001. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in 25 Ontario dairy herds and its association with periparturient health and production. *Bovine. Pract.*, 2001, 35, 8–12.

DYER RM, JENKINS MC, KWOK OC, DOUGLAS LW, DUBEY JP, 2000. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland : risk of serologic reactivity by production groups.*Vet. Parasitol*, 90, 171-181.

E

EIRAS C, ARNAIZ I, ÁLVAREZ-GARCIA G, ORTEGA-MORA LM,. SANJUANL ML, YUS E, DIEGUEZ FJ, 2011. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia, Preventive Veterinary Medicine**,** 98, 2–3, 128-132.

ELLIS JT, RYCE C, ATKINSON R, BALU S, JONES P, HARPER PA, 2000. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. Parasitology**, 120,** 383-390.

ELSHEIKHA HM, MCKINLAY CL, ELSAIED NA, SMITH PA, 2013. Effects of *Neospora caninum* infection on brain microvascular endothelial cells bioenergetics. *Parasites Vectors* **6,** 24.

EZERRA MA, PEREIRA LM, BONONI A, BIELLA CA., BARONI L, POLLO-OLIVEIRA L, YATSUDA AP., 2017. Constitutive expression and characterization of a surface

SRS (NcSRS67) protein of *Neospora caninum* with no orthologue in *Toxoplasma gondii.* Parasitol Int, 66, 173-180

F

F´AVERO JF, DA SILVA AS, CAMPIGOTTO G, MACHADO G, DANIEL DE BARROS L, GARCIA JL, VOGEL FF, MENDES RE, STEFANI LM, 2017. Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. Microb. Pathog. 110, 202–207.

FAGERLAND, M.W., **HOSMER, D.W., 2016**. Tests for goodness of fit in ordinal logistic regression models. *J. Stat. Comput. Simul*., 86(17): 3398-3418.

FÁVERO JF, DA SILVA AS, CAMPIGOTTO G, MACHADO G, DANIEL BL, GARCIA JL, VOGEL FF, MENDE RE, STEFANI LM, 2017. Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. Microbial Pathogenesis, 110, 202–207.

FAZAELI A, CARTER PE, PENNINGTON TH, **2000.** Intergenic spacer (IGS) polymorphism: a new genetic marker for differentiation of *Toxoplasma gondii* strains and *Neospora caninum*. J Parasitol, 86, 716-723.

FELIACHI K, 2003. Rapport National sur les Ressources Génétiques Animales: Algérie commission nationale ANGR, 46p.

FEREIG RM, ABOU LAILA MR, MOHAMED SGA, MAHMOUD HYA, ALI AO, ALI AF, HILALI M, ZAID A, MOHAMED AEA, NISHIKAWA Y, 2016. Serological detection and epidemiology of *Neospora caninum* and *Cryptosporidium parvum* antibodies in cattle in Southern Egypt. *Acta Trop*., 162(1): 206-211.

FERHAT H, OURTANE F, 2016. Impact de la gestation technico-économique sur le développement de la production laitière dans la région de Souk-Ahras. Mémoire de master, ISAV Taoura, université de Souk-Ahras.

FERNANDEZ-GARCIA A, RISCO-CASTILLO V, ZABALLOS A, ALVAREZ-GARCIA G, ORTEGA-MORA LM, 2006. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. Mol Biochem Parasitol, 146, 89-97.

FERRA B, HOLEC-GASIOR L, KUR J, 2015. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. *Parasitol Int*, 64, 288-294.

FERRE I, ADURIZ G, DEL-POZO I, REGIDOR-CERRILLO J, ATXAERANDIO R, COLLANTES- FERNANDEZ E, HURTADO A, UGARTE-GARAGALZA C, ORTEGA-

MORA LM, 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 63, 1504-1518.

FERROGLIO E, PASINO M, ROMANO A, GRANDE D, PREGEL P, TRISCIUOGLIO A, **2007.** Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Vet Parasitol*, **148**, 346-349.

FILHO, NAD, OLIVEIRA PAD, OLIVEIRA FCD, PAPPEN FG, AGUIAR CLG, SANTOS JUNIOR AGD, FARIAS NAD, 2017. PCR-based identification of *Neospora caninum* in the umbilical cord of a newborn calf in Brazil. *Ciên. Rural*, 47(7): 1-7.

FLYNN RJ, MARSHALL ES, **2011**. Parasite limiting macrophages promote IL-17 secretion in naive bovine CD4 (+) T-cells during Neospora caninum infection. Vet Immunol Immunopathol, 144**,** 423-9.

FOSTER RA, 2017. Chapter 18 - Female Reproductive System and Mammae1, Edit.James F. Zachary, Pathologic Basis of Veterinary Disease, Sixth Edition, Mosby.

FROSSLING J, LINDBERG A, BJORKMAN C, 2006. Evaluation of an ISCOM ELISA used for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Prev Vet Med*, 74, 120-129.

FRÖSSLING J, NODTVEDT A, LINDBERG A, BJÖRKMAN C, 2008. Spatial analysis of *Neospora caninum* distribution in dairy cattle from Sweden. *Geospat. Health.* 3**,** 39-45.

FRÖSSLING J, UGGLA A, BJÖRKMAN C, 2005. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected swedish dairy herds. *Vet. Parasitol.*,128, 209-218.

FROSSLING J, VON BLUMRO¨DER D, CONRATHS FJ, SCHARES G, VAN MAANEN C, WOUDA W, ORTEGA-MORA LM**. 2006**. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. Vet. Parasitol. **137:**17–27.

FUCHS N, SONDA S, GOTTSTEIN B, HEMPHILL A, 1998. Differential expression of cell surface- and dense granule-associated Neospora caninum proteins in tachyzoites and bradyzoites. J Parasitol, **84**, 753-758.

G

GEORGIEVA DA, PRELEZOV PN, KOINARSKI VTS, **2006**. *Neospora caninum* and neosporosis in animals - a review. *Bulg. J. Vet. Med.*, **9**, 1-26.

GHALMI F, CHINA B, JENKINS M, AZZAG N, LOSSON B, **2014.** Comparison of different serological methods to detect antibodies specific to Neospora caninum in bovine and canine sera. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Jan;26(1):136-40.

GHALMI F, 2011. La réponse immunitaire induite par *Neospora caninum*.Ann. Méd. Vét.,155, 38-52.

GHALMI F, CHINA B, LOSSON B, 2007. Diagnostic et surveillance épidémiologique de *Neospora caninum. Ann. Méd. Vét*., 151(3): 123-149.

GHALMI F, CHINA B, GHALMI A, HAMMITOUCHE D, LOSSON B, 2012. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. Res. Vet. Science., 93, 655–661.

GHALMI F, CHINA B, KAIDI R LOSSON B, **2011**. *Neospora caninum* is associated with abortion in Algerian cattle. *J. Parasitol*., 97(6): 1121-1124.

GHAREKHANI J, et YAKHCHALI M, 2019. Neospora caninum infection in dairy farms with history of abortion in West of Iran. *Veterinary and Animal Science*, *8*, 100071.

GHAREKHANI J, HADDADZADEH H, BAHONAR A, 2014. Prevalence of immunoglobulin G (IgG) antibody to *Neospora caninum* in dairy cattle of Hamedan province, west of Iran. Vet. Res. Forum 5, 149–152.

GHAREKHANI J, HEIDARI H, AKBAREIN H, 2012. Seroepidemiology of *Neospora caninum* in Iranian native and crossbreed cattle: a cross sectional study. J. Vet. Res. 67, 325–329.

GIBNEY EH, KIPAR A, ROSBOTTOM A, GUY CS, SMITH RF, HETZEL U, TREES AJ, WILLIAMS DJ. **2008**. 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. Int J Parasitol, 38**,** 579-88.

GINDRI PC, MION B, PRADIEÉ J, BIALVES TS, SOUZA GND, DELLAGOSTIN OA , SCHNEIDER A, PEGORARO LMC, 2018. Seroprevalence estimate and associated risk factors for neosporosis in dairy cattle in the northwest region of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciência Rural*, *48*.

GÖKPINAR S. 2021. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in Cattle in Oğuzlar region. *Türk. Parazitol. Derg*., 45(2): 108.

GONDIM L. F., GAO L., MCALLISTER M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. *J. Parasitol*., 2002, **88**, 1159- 1163.

GONDIM L.F.P., MCALLISTER M.M., GAO L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. Veterinary Parasitology. 2005;134:33–39.

GONDIM LF, MCALLISTER MM, PITT WC, ZEMLICKA DE, 2004. Coyotes (Canis latrans) are definitive hosts of Neospora caninum. International journal for parasitology 34, 159-161.

GONDIM LFP, MINEO JR, SCHARES G, 2017. Importance of serological crossreactivity among Toxoplasma gondii, Hammondia spp., Neospora spp., Sarcocystis spp. and Besnoitia besnoiti. Parasitology, 144, 851-868.

GONDIM LFP., GAO L, MCALLISTER MM, 2002. Improved production of Neospora caninum oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. J. Parasitol. 88, 1159–1163.

GONZÁLEZ-WARLETA M, CASTRO-HERMIDA JA, CALVO C, PÉREZ V, GUTIÉRREZ-EXPÓSITO D, REGIDOR-CERRILLO J, ORTEGA-MORA LM , MEZO, M, 2018. Endogenous transplacental transmission of Neospora caninum during successive pregnancies across three generations of naturally infected sheep.Veterinary Research, 49(1): 106.

GOODSWEN SJ, KENNEDY PJ, ELLIS JT, 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect Genet Evol*, **13**, 133-150.

GOTTSTEIN B, HENTRICH B, WYSS R, THUR B, BUSATO A, STARK KD, MÜLLER N, 1998. Molecularn and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.*, , **28,** 679-691.

GOTTSTEIN B, HENTRICH B, WYSS R, THUR B, BUSATO A, STARK KD, MÜLLER N, 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. Int. J. Parasitol., **28**, 679-691

GREENACRE M, 2016. Correspondence Analysis in Practice. 3rd ed. Chapman and Hall/CRC, London, United Kingdom. p326.

GROSS U, HOLPERT M, GOEBEL S, **2004**. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 40, 65-70.

GUIDO S, KATZER F, NANJIANI I, MILNE E, INNES EA, **2016.** Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. *Trends Parasitol*, **32**, 131-143.

GUIMARAES JSJR., SOUZA SL, BERGAMASCHI DP, GENNARI SM, 2004. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. *Vet. Parasitol.*,124, 1-8.

GUINOT P, 2005. Etude séroépidémiologique de la Néosporose bovine dans 42 élevages des Pyrénées-Atlantiques, PhD, dissertation, 126p.

GUIONAUD C, HEMPHILL A, MEVISSEN M, ALAEDDINE F, **2010**. Molecular characterization of Neospora caninum MAG1, a dense granule protein secreted into the parasitophorous vacuole, and associated with the cyst wall and the cyst matrix. Parasitology, 137, 1605-1619

H

HABERMEHL, K.-H. DIE ALTERSBESTIMMUNG BEI HAUS- UND LABORTIEREN, 2nd ed.; Parey: Berlin, Germany, 1975; ISBN 3489683161.

HADDAD JPA, DOHOO IR, VANLEEWEN JA, 2005. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle — a Canadian perspective. The Canadian Veterinary Journal 46, 230-243.

HAERDI C., HAESSIG M., SAGER H., GREIF G., STAUBLI D., GOTTSTEIN B. (2006) Humoral immune reaction of newborn calves congenitally infected with *Neospora caninum* and experimentally treated with toltrazuril. *Parasitol Res*, 99, 534-540.

HAJI HAJIKOLAEI MR, HAMIDINEJAT H, GHORBANPOOR M, GORANINEJAD S, 2008. Serological study of *Neospora caninum* infection in cattle from Ahvaz, Iran. Int. J. Vet. Med. Res. Rep. 2, 63–66.

HALDORSON GJ, STANTON JB., MATHISON B. A., SUAREZ C. E., BASZLER TV, 2006. *Neospora caninum*: antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. Exp Parasitol, 112, 172-178.

HALL CA, REICHEL MP, ELLIS JT, 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol*, **128**, 231-241.

HÄSLER B, HERNANDEZ JA, REIST M, SAGER H, STEINER-MORET C, STAUBLI D, STARK KD, GOTTSTEIN B. *Neospora caninum* : Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. *Vet. Parasitol*., 2006a, **137**, 222-230.

HASLER B, STARK K, GOTTSTEIN B, REIST M, 2008. Epidemiologische und finanzielle entscheidungsgrundlagen zur kontrolle von *Neospora caninu*m auf Schweizer milchviehbetrieben. [Epidemiological and financial considerations for the control of *Neospora caninum* on Swiss dairy farms]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 150, 273-280.

HECKER YP, COCERES V, WILKOWSKY SE, JARAMILLO ORTIZ JM, MORRELL EL, VERNA AE, GANUZA A, CANO DB, LISCHINSKY L, ANGEL SO, ZAMORANO P, ODEON AC, LEUNDA MR, CAMPERO CM, MOREIN B, MOORE DP, **2014**. A *Neospora caninum* vaccine using recombinant proteins fails to prevent foetal infection in pregnant cattle after experimental intravenous challenge. *Vet Immunol Immunopathol*, 162, 142-153.

HEIN EH, MACHADO G, MIRANDA ICS, COSTA EF, PELLEGRINI DCP, DRIEMEIER D, CORBELLIN LG. Neosporose bovina: avaliação da transmissão vertical e fração atribuível de aborto em uma população de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 396-400, 2012.

HELMAN RG, STAIR EL, LEHENBAUER TW, RODGERS S, SALIKI JT, 1998. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. J Vet Diagn Invest, 10, 292-295.

HEMPHILL A, GAJENDRAN N, SONDA S, FUCHS N, GOTTSTEIN B, HENTRICH B, JENKINS M, **1998**. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in Neospora caninum tachyzoites. Int J Parasitol, 28, 429-438.

HEMPHILL A, GOTTSTEIN B, KAUFMANN H, **1996**. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by Neospora caninum. Parasitology, 112 :183-97.

HEMPHILL A, AGUADO-MARTINEZ A, MULLER J, 2016. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. *Parasitology*, 143, 245-259.

HEMPHILL A, GOTTSTEIN B, 2000. An European perspective on Neospora caninum. Int. J. Parasitol., 2000, 30, 8, 877-924.

HIETALA SK, THURMOND MC, 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int J Parasitol*, **29**, 1669-1676.

HILL D, COSS C, DUBEY JP, WROBLEWSKI K, SAUTTER M, HOSTEN T, MUNOZ-ZANZI C, MUI E, WITHERS S, BOYER K, HERMES G, COYNE J, JAGDIS F, BURNETT A, MCLEOD P, MORTON H, ROBINSON D, MCLEOD R, 2011. Identification of a sporozoite-specific antigen from Toxoplasma gondii. J Parasitol, 97, 328-337.

HO MSY, BARR BC, ROWE JD, ANDERSON ML, SVERLOW KW, PACKHAM A, MARSH AE, CONRAD PA, 1997. Detection of Neospora s p, from infected bovine tissues tissues by PCR and probe hybridization. Journal of Parasitology, 83, 508-514.

HOAR BR; RIBBLE CS; SPITZER CC; SPITZER PG, JANZEN ED, **1996.** Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with Neospora sp. Infection. Gan. Vet. J. ,37(6):364-366.

HOBSON JC, DUFFIELD TF, KELTON D, LISSEMORE K, HIETALA SK, LESLIE K E, MCEWEN B, PEREGRINE AS, **2005**. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Vet. Parasitol.*, 127**,** 177-88.

HÖGLUND S, DALSGAARD K, LÖVGREN K, SUNDQUIST B, OSTERHAUS A, MOREIN B. ISCOMs and immunostimulation with viral antigens. *Subcell. Biochem.*, 1989, **15,** 9-68.

HOLEC-GASIOR L, 2014. The optimal mixture of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, P22, ROP1) for diagnosis of ovine toxoplasmosis. *Vet parasitol*, 206,146-152.

HOLMDAHL OJ, MATTSSON JG, 1996. Rapid and sensitive identification of Neospora caninum by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. Parasitology, 112, 177-182.

HORCAJO P, REGIDOR-CERRILLO J, AGUADO-MARTINEZ A, HEMPHILL A, ORTEGA-MORA LM, 2016 .Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. *Parasite Immunol*, 38, 709-723.

HOSSEININEJAD M, MAHZOUNIEH M, SHAMS ESFANDABADI N, 2017. *Neospora caninum* suspects as one of the most important causes of abortion in large dairy farms in Isfahan, Iran. Iranian Journal of Parasitology, 12, 408–412.

HOWE DK, TANG K, CONRAD PA, SVERLOW K, DUBEY JP, SIBLEY LD, 2002. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9,** 611-615.

HOWE DK, CRAWFORD AC, LINDSAY D, SIBLEY LD, 1998. The p29 and p35 immunodominant antigens of Neospora caninum tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of Toxoplasma gondii. Infect Immun, 66, 5322-5328.

HUANG P, LIAO M, ZHANG H, LEE EG, NISHIKAWA Y, XUAN X, 2007. Dense-granule protein NcGRA7, a new marker for the serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in aborting cows. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 1640-1643.

HUGHES HP, VAN KNAPEN F, ATKINSON HJ, BALFOUR AH, LEE DL, 1982. A new soluble antigen preparation of *Toxoplasma gondii* and its use in serological diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **49,** 239-46.

I

IBRAHIM. AME., ELFAHAL AM., ELHUSSEIN ARM, 2012. First report of *Neospora caninum* infection in cattle in Sudan.Trop. Anim. Health. Prod., 44, 769–772.

ICHIKAWA-SEKI M, GUSWANTO A, ALLAMANDA P, MARIAMAH ES, WIBOWO PE, NISHIKAWA Y, 2016. Seroprevalence of antibody to NcSAG1 antigen of *Neospora*

caninum in cattle from Western Java, Indonesia. The Journal of Veterinary Medical Science, 78, 121–123.

INNES EA, **2007**.The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology*, 134, 1903-1910.

INNES EA, PANTON WRM, SANDERSON A, THOMSON KM, WASTLING JM, MALEY S, BUXTON D, 1995. Induction of CD4+ and CD8+ T cell response in efferent lymph responding to Toxoplasma gondii infection: analysis of phenotype and function. Parasite Immunol. , 17, 151-160.

INNES EA, WRIGHT S, BARTLEY P, MALEY S, MACALDOWIE C, ESTEBAN-REDONDO I, BUXTON D, **2005.**The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol*.**,** 108**,** 29-36.

INNES EA, WRIGHT SE, MALEY S, RAE A, SCHOCK A, KIRVAR E, BARTLEY P, HAMILTON C, CAREY IM, BUXTON D, 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. International Journal for Parasitology, 31,1523-1534.

INNES EA, ANDRIANARIVO AG, BJOORKMAN C, WILLIAMS DJL, CONRAD PA, 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends in Parasitology, 18, 497-504.

INNES EA, BUXTON D, MALEY S, WRIGHT S, MARKS J, ESTEBAN I, RAE A, SCHOCK A, WASTLING J, 2000. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. Annals of the New York Academy of Sciences, 916: 93-101.

ITEBO (Institut Technique de l'Elevage Bovin et Ovin en Algérie). Connaissance de la race bovine algérienne, Blida, 1997, 4p.

J

JARDINE JE, 1996. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cyst of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. Vet . parasitol.;62;231-240.

JARDINE JE, LAST RD, 1995. The prevalence of neosporosis in aborted bovine foetuses submitted to the Allerton Regional Veterinary Laboratory. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 62: 207-209.

JENKINS MC, WOUDA W, DUBEY JP, 1997. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.***, 4**, 270-274.

JENKINS M, BASZLER T, BJORKMAN C, SCHARES G, WILLIAMS D, **2002.** Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int J Parasitol*,32, 631-636.

JENKINS MC, CAVER JA, BJORKMAN C, ANDERSON TC, ROMAND S, VINYARD B, UGGLA A, THULLIEZ P, DUBEY JP, 2000. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States.*Vet Parasitol*, 94, 17-26.

JENSEN AM, BJO¨RKMAN CAM, KJELDSEN A, WEDDERKOPP C, WILLADSEN A, UGGLA P, LIND, 1999. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. Prev. Vet. Med. 40**:**151–163.

JOSHI NR, MCLAUGHLIN E, PHILLIPS RW. Les bovins d'Afrique: types et races. Agricultural Studies No. 37. Rome, FAO,1957, 317p. Cité par **BELCACEM S et BENABBAS K 1998.** Principaux essais entrepris au maghreb pour la connaissance de la race bovine locale la brune de l'atlas. Thèse d'ingénieur,INA, El harrach-Alger, , 80p.

JOURNEL C, PITEL PH, 2001. La lutte contre la neosporose en élevage. bovin. Point. Vét., 32, 38-39.

K

KACAR C, GOKCE HI, AKCA A, GUNGOR O, KAYA S, 2012. Seroprevalence of *Neospora caninum* in cows with abortion history and in dogs sharing the same area in the Kars Region, Turkey. Revue Méd. Vét., , 163(7), 343-347.

KAMALI A, SEIFI HA, MOVASSAGHI AR, RAZMI GR, NASERI Z. 2014 Histopathological and molecular study of *Neospora caninum* infection in bovine aborted fetuses,Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4, 12, 990-994.

KAMGA-WALADJO AR, GBATI OB, KONE P, LAPO RA, CHATAGNON G, BAKOU SN, PANGUI LJ, DIOP PE, AKAKPO JA, TAINTURIER D, 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its Consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar–Senegal, West Africa. Trop. Anim. Health. Prod. 42, 953–959.

KAMGA-WALADJO KP, GBATI OB, MOUGANG FJ, DIALLO PM, BAKOU SN, DIOP PEH, TAINTURIER D, 2012. Séroprévalence de la néosporose et conséquences sur la fertilité des vaches laitières à Dakar – Sénégal. Renc. Rech. Ruminants, 19, 351.

KANG SW, KWEON CH, LEE EH, CHOE SE, JUNG SC, QUYEN DV, 2008a. The differentiation of transcription between tachyzoites and bradyzoites of in vitro cultured *Neospora caninum.* Parasitol Res, 103, 1011-1018.

KANG SW, LEE EH, JEAN YH, CHOE SE, VAN QUYEN D, LEE MS, 2008b. The differential protein expression profiles and immunogenicity of tachyzoites and bradyzoites of in vitro cultured *Neospora caninum*. Parasitol Res, 103, 905-913.

KASHIWAZAKI Y, GIANNEECHINI RE, LUST M, GIL J, 2004. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. Vet. Parasitol., 120, 139-144.

KASHIWAZAKI Y., PHOLPARK S., CHAROENCHAI A., POLSAR C., TEEVERAPANYA S., PHOLPARK M. Postnatal neosporosis in dairy cattle in northeast Thailand. *Vet. Parasitol.*, 2001**, 94,** 217-20.

KASPER L. H., 1989. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun, 57, 668-672.

KELLER N, RIESEN M, NAGULESWARAN A, VONLAUFEN N, STETTLER R, LEEPIN A, WASTLING JM, HEMPHILL A, 2004. Identification and characterization of a Neospora caninum micronème-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. Infect Immun, 72, 4791-4800.

KELLER N., NAGULESWARAN A., CANNAS A., VONLAUFEN N., BIENZ M., BJORKMAN C., BOHNE W., HEMPHILL A. 2002. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. Infect Immun, 70, 3187-3198.

KEMP LE, YAMAMOTO M, SOLDATI-FAVRE D, 2013. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. FEMS Microbiol Rev, 37, 607-631.

KIM JH, SOHN HJ, HWANG WS, HWANG EK, JEAN YH, YAMANE I, KIM DY, **2000**. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. Veterinary parasitology 90, 147-154.

KIM JH, LEE JK, LEE BC, PARK HS, YOO BK, , HWANG WS, SHIN NR, KANG MS, JEAN YH, YOON HJ, KANG SK, KIM DY, 2002. Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. J. Vet. Med. Sci**. 64:**1123–1127.

KLAUCK V, MACHADO G, PAZINATO R, RADAVELLI WM, SANTOS DS, BERWAGUER JC, BRAUNIG P, VOGEL FF, DA SILVA AS. 2016. Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. *Microbial pathogenesis*, *92*, 46–49.

KOIWAI M, HAMAOKA T, HARITANI M, SHIMIZU S, ZENIYA Y, ETO M, YOKOYAMA R, TSUTSUI T, KIMURA K, YAMANE I, 2006. Nationwide seroprevalence of *Neospora caninum* among dairy cattle in Japan. *Vet. Parasitol.*,135, 175-179.

KÖSE O, ADANIR R, KOCAMÜFTÜOĞLU M, ÇETIN Y., 2021. Investigation of *Neospora caninum*Seroprevalence and Association with Reproductive Problems in Cows in Burdur Province of Turkey. *Iran J Parasitol*;16(3):386-393.

KOTERBA AM, HOUSE JK, 1996. Neonatal infection in large animal internal medicine, Smith BP Ed. Mosby, Saint- Louis, 344-353.

KOWALCZYK SJ, CZOPOWICZ M, WEBER CN, MÜLLER E, WITKOWSKI L, KABAM J, 2016. Herd-level seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in central and northeastern Poland. Acta Parasitologica, 61, 63–65.

KOYAMA T, KOBAYASHI Y, OMATA Y, YAMADA M, FURUOKA H, MAEDA R, MATSUI T, SAITO A, MIKAMI T, 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. J Parasitol 87, 1486-1488.

KYAW T, VIRAKUL P, MUANGYAI M, SUWIMONTEERABUTR J, 2004. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle in central Thailand. *Vet. Parasitol.*, 2004, 121, 255-263

L

LAIDI W, 2015. Les caractères morphologiques et zootechniques de la race bovine locale à l`Est de l'Algérie. ENSV, El Harrach- Alger, 59p.

LAGOMARSINO, H., SCIOLI, A., RODRIGUEZ, A., ARMENDANO, J., FIORANI, F., BENCE, A., MOORE, D. 2019. Controlling endemic Neospora caninum-related abortions in a dairy herd from Argentina. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 446.

LALLY NC, JENKINS MC, DUBEY JP, 1996a. Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the Neospora caninum 14-3-3 gene. Mol Biochem Parasitol, 75, 169-178.

LALLY NC, JENKINS MC, DUBEY JP, **1996b**. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diagn. Lab.Immunol.*, 3**,** 275-9.

LARSON RL, HARDIN DK, PIERCE VL, 2004. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 224, 1597-1604.

LASRI S, DE MEERSCHMAN F, RETTIGNER C, FOCANT C, LOSSON B, **2004.** Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies.*Vet. Parasitol*., 123, 25-32.

LEVIEUX D. 1984. Transmission de l'immunité colostrale chez le veau. Le Point Vétérinaire 16, 82, 311-315.

LI W, LIU J, WANG J, FU Y, NAN H, LIU Q, 2015. Identification and characterization of a micronème protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. Parasitol Res, 114, 2893-2902.

LIAO M, XUAN X, HUANG X, SHIRAFUJI H, FUKUMOTO S, HIRATA H, SUZUKI H, FUJISAKI K , 2005. Identification and characterization of cross-reactive antigens from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 130, 481-488.

LIDDELL S, JENKINS MC, DUBEY JP, 1999. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. Int J Parasitol, 29, 1583-1587.

LINDSAY DS, DUBEY JP, 1989b. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.*, 50**,** 1981-3.

LINDSAY DS, DUBEY JP, DUNCAN RB, 1999a. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Veterinary parasitology 82, 327-333.

LINDSAY DS, LITTLE SE, DAVIDSON WR, 2002. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer, Odocoileus virginianus, from the southeastern United States. J Parasitol 88, 415-417.

LINDSAY DS, SPEER CA, TOIVIO-KINNUCAN MA, DUBEY JP, BLAGBURN BL, **1993**. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and Toxoplasma gondii. Am J Vet Res 54, 103-106.

LINDSAY DS, UPTON SJ, DUBEY JP, 1999b. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. International journal for parasitology 29, 1521-1523.

LIU J, YU J, WANG M, LIU Q, ZHANG W, DENG C, DING J, 2007. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle using a recombinant tNcSRS2 protein-based ELISA. *Vet Parasitol*, 143, 358-363.

LLANO H, GUIMARÃES MS, SOARES RM, POLO G, DA SILVA AC, 2018. Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* infection in cattle from the eastern Antioquia, Colombia. *Veterinary and animal science*, 6, 69–74.

LOPEZ-GATIUS F., SANTOLARIA P., ALMERIA S. Neospora caninum infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of Neospora-associated abortions. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health., 2005, 52, 51-53.

LOSSON B., BOURDOISEAU G. *Neospora caninum*, un nouvel agent abortif chez les bovins . Bulletin des GTV, 2000 ,**7**,107-114.

LOUIE K, SVERLOW KW, BARR BC, ANDERSON ML, CONRAD PA, **1997**. Cloning and characterization of two recombinant *Neospora* protein fragments and their use in serodiagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 4, 692-699.

LÖVGREN K, LINDMARK J, PIPKORN R, MOREIN B, 1987. Antigenic presentation of small molecules and peptides conjugated to a preformed iscom as carrier. *J. Immunol. Methods.*, 98**,** 137-43.

LUCCHESE L, BENKIRANE A, HAKIMI I, EL IDRISSI A, NATALE A, 2016. Seroprevalence study of the main causes of abortion in dairy cattle in Morocco. Veterinaria Italiana, 52, 13–19.

LUNDEN A, LÖVGREN BENGTSSON K, SJÖLANDER A, UGGLA A, **1996**. Iscoms in parasitological research. *Parasitol. Today.*, 12**,** 320-3.

LYONS RE, MCLEOD R, ROBERTS CW, 2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. Trends in parasitology 18, 198-201. Lyons, R.E., McLeod, R., Roberts, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. Trends in parasitology 18, 198-201.

M

MA L, LIU J, LI M, FU Y, ZHANG X, LIU Q, 2017. Rhoptry protein 5 (ROP5) is akey virulence factor in *Neospora caninum*. Front Microbiol, **8**, 370.

MACALDOWIE C, MALEY SW, WRIGHT S, BARTLEY P, ESTEBAN-REDONDO I, BUXTON D, INNES EA, 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Journal of comparative pathology*, *131*(2-3), 142-156.

MAHAJAN M, BANGA HS, FILIA G, 2019. Patho-epidemiological and risk factor studies for detection of *Neospora*-associated abortion in cattle and buffaloes in Punjab, India. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, 38(3): 1-14.

MAINAR-JAIME RC, BERZAL-HERRANZ B, ARIAS P, ROJO-VAZQUEZ FA, 2001. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea virus (BVDV)

infection in a non-vaccinated dairy-cattle population from the Asturias region of Spain. *Prev Vet Med*, 52, 63-73.

MAINAR-JAIME RC, THURMOND MC, BERZAL-HERRANZ B, HIETALA SK, 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet. Rec.*, 145, 72-5.

MALEY SW, BUXTON D, THOMSON KM, SCHRIEFER CE, INNES EA, 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum* : a 1-year study. *Vet. Parasitol.*, 96, 1-9.

MALEY SW, BUXTON D, MACALDOWIE CN, ANDERSON IE, WRIGHT SE, BARTLEY PM, ESTEBAN-REDONDO I, HAMILTON CM, STORSET AK, INNES EA, 2006. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. J Comp Pathol, 135**,** 130 41.

MANCA R, CICCARESE G, SCALTRITO D, CHIRIZZI D, 2022. Detection of Anti-*Neospora caninum*Antibodies on Dairy Cattle Farms in Southern Italy. *Veterinary sciences*, *9*(2), 87.

MARSH AE, BARR BC, PACKHAM AE, CONRAD PA, 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). J. Parasitol., 84, 983-991.

MARUGAN-HERNANDEZ V, 2017. *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. J. Comp. Path., Vol. 157, 193-200.

MARUGAN-HERNANDEZ V, ALVAREZ-GARCIA G, RISCO-CASTILLO V, REGIDOR-CERRILLO J, ORTEGA-MORA LM, **2010**. Identification of *Neospora caninum* proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE. Proteomics, 10, 1740-1750.

MAZUZ ML, FISH L, REZNIKOV D, WOLKOMIRSKY R, LEIBOVITZ B, SAVITZKY I, GOLENSER J, SHKAP V, 2014. Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle. *Vet Parasitol*, 205, 85-91.

MAZUZ ML, FISH L, WOLKOMIRSKY R, LEIBOVICH B, REZNIKOV D, SAVITSKY I, GOLENSER J, SHKAP V, 2015. The effect of a live *Neospora caninum* tachyzoite vaccine in naturally infected pregnant dairy cows. *Prev Vet Med*, 120, 232-235.

MCALLISTER MM, 2016. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 2016 Jul 1;32(2):443-63.

MCALLISTER MM, DUBEY JP, LINDSAY DS, JOLLEY WR, WILLS RA, MCGUIRE AM, 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 28**:**1473–1478.

MCALLISTER MM, 2016. Diagnosis and control of Bovine Neosporosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 32:443–63.

MCALLISTER MM, BJORKMAN C, ANDERSON-SPRECHER R, ROGERS DG, **2000.** Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J Am Vet Med Assoc*, 217, 881-887.

MCALLISTER MM, DUBEY JP, LINDSAY DS, JOLLEY WR, WILLS RA, MCGUIRE, AM, 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. International journal for parasitology 28, 1473-1478.

MCCANN CM, MCALLISTER MM, GONDIM LF, SMITH RF, CRIPPS PJ, KIPAR A, WILLIAMS DJ, TREES AJ, 2007. *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. International journal for parasitology 37, 1631-1639.

MCGARRY JW, GUY F, TREES AJ, WILLIAMS DJL, 2000. Validation and application of an inhibition ELISA to detect serum antibodies to *Neospora caninum* in different host species. In **HEMPHILL A, GOTTSTEIN B,** (eds) : A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 30, 880-884.

MCGUIRE AM, MCALLISTER MM, JOLLEY WR, ANDERSON-SPRECHER RC, 1997b. A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. J Parasitol, 83, 647-651.

MCINNES LM, RYAN UM, O'HANDLEY R, SAGER H, FORSHAW D, PALMER DG, 2006b. Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. *Vet Parasitol*, 142, 207-213.

MCNAMEE PT, TREES AJ, GUY F, MOFFETT D, KILPATRICK D, **1996**. Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, 138**,** 419-20.

MEDINA L, CRUZ-VAZQUEZ C, QUEZADA T, MORALES E, GARCIA-VAZQUEZ Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.*, 2005, 136**,** 187-91.

MEDINA-ESPARZA L, REGIDOR-CERRILLO J, GARCIA-RAMOS D, ALVAREZ-GARCIA G, BENAVIDES J, ORTEGA-MORA LM, CRUZ-VAZQUEZ C, 2016. Genetic characterization of *Neospora caninum* from aborted bovine foetuses in Aguascalientes, Mexico. Vet Parasitol, 228, 183-187.

MEENAKSHI SANDHU KS, BALL MS, KUMAR H, SHARMA S, SIDHU PK, SREEKUMAR C, DUBEY JP, 2007. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle and water buffaloes in India. *J. Parasitol.*, 93**,** 1374-7.

MERCIER C, CESBRON-DELAUW MF, 2015. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? Trends Parasitol, 31, 60-71.

MILNE E, CRAWSHAW M, BROCKLEHURST S, WRIGHT S, MALEY S, INNES E, 2006. Associations between *Neospora caninum* specific antibodies in serum and milk in two dairy herds in Scotland. *Prev Vet Med*, 77, 31-47.

MOEN AR, WOUDA W, MUL MF, GRAAT EA, VAN WERVEN T, **1998.** Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks : a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*.**,** 49**,** 1301-1309.

MOLINA-LÓPEZ R, CABEZÓN O, PABÓN M, DARWICH L, OBÓN E, LOPEZ-GATIUS F, DUBEY JP, ALMERÍA S, 2012. High seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in the Common raven (Corvus corax) in the Northeast of Spain. Research in Veterinary Science 93, 300-302.

MOORE DP. Neosporosis in South America. *Vet. parasitol.*, 2005, 127, 87-97.

MOORE DP, CAMPERO CM, ODEON AC, POSSO MA, CANO D, LEUNDA MR, BASSO W, VENTURINI MC, SPATH E, 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.*, 2002, 107, 303-316.

MORALES E, TRIGO FJ, IBARRA F, PUENTE E, SANTACRUZ M, 2001. Neosporosis in Mexican Dairy Herds: Lesions and Immunohistochemical Detection of *Neospora caninum* in Fetuses. Journal of Comparative Pathology, 125(1), 58–63.

MORE G, BACIGALUPE D, BASSO W, RAMBEAUD M, BELTRAME F, RAMIREZ B, VENTURINI MC, VENTURINI L, 2009. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet Parasitol*, 160, 51-54.

MORENO B, COLLANTES-FERNÁNDEZ E, VILLA A, NAVARRO A, REGIDOR-CERRILLO J. & ORTEGA-MORA L.M., 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and Toxoplasma gondii infections in ovine and caprine abortions. Vet. Parasitol. 187:312-318.

MOSKWA B, PASTUSIAK K, BIEN J, CABAJ W, 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol Res*, 100, 633-636.

MOSKWA B, CABAJ W, PASTUSIAK K, BIEN J, 2003. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. Acta Parasitol**. 48:**138–141.

MOURA AB, SOUZA AP, SARTOR AA, V BELLATO V, TEIXEIRA EB, 2012. Anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en rebaños lecheros de la ciudad de Lages, Estado de Santa Catarina, Brasil**.** Archivos de Medicina Veterinaria, v. 44, p. 117-122.

MULLER J, HEMPHILL A, 2013. New approaches for the identification of drug targets in protozoan parasites. *Int Rev Cell Mol Biol*, 301, 359-401.

N

NAGULESWARAN A, CANNAS A, KELLER N, VONLAUFEN N, SCHARES G, CONRATHS FJ, BJORKMAN C, HEMPHILL A, 2001. *Neospora caninum* micronème protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. Infect Immun, 69, 6483-6494.

NAKAGAKI KYR, ABREU CC, COSTA RC, ORLANDO DR, FREIRE LR, BRUHN FR P, PECONICK AN, WOUTERS F, WOUTERS ATB, RAYMUNDO DL, VARASCHIN, MS, 2016. Lesions and distribution of *Neospora caninum* in tissues of naturally infected female goats. Small Ruminant Research, 140, 57–62.

NAZIR MM, MAQBOOL A, KHAN M S, SAJJID A, LINDSAY DS, 2013. Effects of age and breed on the prevalence of *Neospora caninum* in commercial dairy cattle from Pakistan. *The Journal of parasitology*, *99*(2), 368–370

NEMATOLLAHI A, JAAFARI R, MOGHADDAM G, 2011. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in Dairy Cattle in Tabriz, Northwest Iran. *Iranian journal of parasitology*, *6*(4), 95–98.

NEMATOLLAHI A, MOGHADDAM GH, JAAFARI R, HELAN JA, NOROUZI M, 2013. Study on outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in dairy cows in Tabriz (Northwest Iran) by serological, molecular and histopathologic methods. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, *6*(12), 942–946.

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, 223-6.

NISHIKAWA Y, XUAN X, NAGASAWA H, IGARASHI I, FUJISAKI K, OTSUKA H, MIKAMI T, 2000. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. Int J Parasitol, 30, 51-58.

NISHIKAWA Y., INOUE N., XUAN X., NAGASAWA H., IGARASHI I., FUJISAKI K., OTSUKA H., MIKAMI T, 2001a. Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection. *Vaccine.* 19**,** 1381-90.

NISHIMURA M, KOHARA J, HIASA J, MUROI Y, YOKOYAMA N, KIDA K, XUAN X, FURUOKA H, NISHIKAWA Y, 2013a. Tissue distribution of *Neospora caninum* in experimentally infected cattle. Clin Vaccine Immunol, 20, 309-312.

NISHIMURA M, TANAKA S, IHARA F, MUROI Y, YAMAGISHI J, FURUOKA, H, SUZUKI Y, NISHIKAWA Y, **2015**. Transcriptome and histopathological changes in mouse brain infected with *Neospora caninum*. Sci Rep 5, 7936.

NISHIMURA M, KOHARA J, KURODA Y, HIASA J, TANAKA S, MUROI Y, KOJIMA N, FURUOKA H, NISHIKAWA Y, 2013b. Oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle.*Vaccine*, 31, 3528-3535.

NOGAREDA C, L´OPEZ-GATIUS F, SANTOLARIA P, GARCÍA-ISPIERTO I, BECH-S`ABAT G, PAB´ON M, MEZO M, GONZALEZ-WARLETA M, CASTRO-HERMIDA JA, Y´ANIZ J, ALMERIA S, 2007. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. Vet. Parasitol. 148, 193–199.
North Am Food Anim Pract, 32, 443-463.

O

OKEOMA CM, WILLIAMSON NB, POMROY WE, STOWELL KM, GILLESPIE LM 2004b. Isolation and molecular characterisation of *Neospora caninum* in cattle in New.

OKEOMA CM, WILLIAMSON NB, POMROY WE, STOWELL KM, GILLESPIE L, 2004. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. *Vet Parasitol*, 122, 307-315.

OLMO L, REICHEL MP, NAMPANYA S, KHOUNSY S, WAHL LC, CLARK BA, THOMSON PC, WINDSOR PA, BUSH RD, 2019. Risk factors for *Neospora caninum*, bovine viral diarrhoea virus, and *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection in smallholder cattle and buffalo in Lao PDR. PLoS One 14, e0220335.

OMATA Y, NIDAIRA M, KANO R, KOBAYASHI Y, KOYAMA T, FURUOKA H, MAEDA R, MATSUI T, SAITO A, 2004. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice in both acute and chronic infection. Veterinary Parasitology, 121**:** 323-8.

ORTEGA YR, TORRES MP, MENA KD, 2007. Presence of *Neospora caninum* specific antibodies in three dairy farms in Georgia and two in Texas. Veterinary Parasitology, 144, 353–355.

ORTEGA-MORA LM, FERNÁNDEZ-GARCÍA A, GÓMEZ-BAUTISTA M. **2006**. Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspective. *Acta Parasitol*, 51, 1-14.

ORTEGA-MORA LM, FERRE I, DEL-POZO I, CAETANO-DA-SILVA A, COLLANTES-FERNANDEZ E, REGIDOR-CERRILLO J, UGARTE-GARAGALZA C, ADURIZ G, 2003. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet Parasitol*, 117, 301-308.

OSAWA T, WASTLING J, ACOSTA L, ORTELLADO C, IBARRA J, INNES EA, 2002. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. Vet. Parasitol., 110, 17-23.

OSAWA T, WASTLING J, MALEY S, BUXTON D, INNES E, 1998, . A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Vet. Parasitol.*, ,79,19-34.

OSAWA, T., J. WASTLING, L. ACOSTA, C. ORTELLADO, J. IBARRA, AND E. A. INNES. 2002. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. Vet. Parasitol. 110**:**17–23.

OTRANTO D, LLAZARI A, TESTINI G, TRAVERSA D, FRANGIPANE DI REGALBONO A, BADAN M et CAPELLI G, 2003. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet. Parasitol*., 118(1-2): 7-18.

OTSUKI T, DONG J, KATO T, PARK EY, 2013. Expression, purification and antigenicity of *Neospora caninum*-antigens using silkworm larvae targeting for subunit vaccines. Vet Parasitol, 192, 284-287.

OTTER A, JEFFREY M., SCHOLES SF, HELMICK B, WILESMITH JW, TREES AJ, 1997. Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Vet. Rec*., 141, 487-489.

OULD-AMROUCHE A, KLEIN F, OSDOIT C, MOHAMED HO, TOURATIER A, SANAA M, MIALOT JP. 1999. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. Vet. Res. 30:531–538.

P

PABON M, LOPEZ-GATIUS F, GARCIA-ISPIERTO I, BECH-SABAT G, NOGAREDA C, ALMERIA S, 2007. Chronic *N eospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows : a 3-year study. Vet. Parasitol.,147, 40-6.

PACKHAM AE, SVERLOW KW, CONRAD PA, LOOMIS EF, ROWE JD, ANDERSON ML, MARSH AE, CRAY C, BARR BC, 1998. A modified agglutination test for *Neospora*

caninum: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescentantibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, **5**, 467-473.

PALAVICINI P, ROMERO JJ, DOLZ G, JIMENEZ AE, HILL DE, DUBEY JP, 2007. Fecal and serological survey of *Neospora caninum* in farm dogs in Costa Rica. *Vet. Parasitol.***,** 149, 265-70.

PARADIES P, CAPELLI G, TESTINI G, CANTACESSI C, TREES AJ, OTRANTO D, 2007. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. *Vet. Parasitol.*, , 145**,** 240-4.

PARE J, FECTEAU G, FORTIN M, MARSOLAIS G, 1998. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 213, 1595-8.

PARE J, HIETALA SK, THURMOND MC, 2005. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora sp*. Infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1995, **7**, 352-359.

PARE J, THURMOND MC, HIETALA SK, 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res*, 60, 133-139.

PARE J, THURMOND MC, HIETALA SK, **1997.** *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.*, 83, 82-87.

PAULA VS, RODRIGUES AA, RICHTZENHAIN LJ, CORTEZ A, SOARES RM, GENNARI SM, 2004. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of Neospora caninum in brain tissues of bovine aborted fetuses. Vet. Res. Commun., 28, 581-685.

PEREIRA GR, VOGEL FS, BOHRER RC, DA NÓBREGA JEJR, ILHA GF, DA ROSA PR, GLANZNER WG, CAMILLO G, BRAUNIG P, DE OLIVEIRA JF, GONÇALVES PB, 2014. *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally infected pregnant heifers. Vet. Parasitol. 199, 129-135.

PEREIRA-BUENO J, QUINTANILLA-GOZALO A, PEREZ-PEREZ V, ESPI-FELGUEROSO A, ALVAREZ-GARCIA G, COLLANTES-FERNANDEZ E, ORTEGA-MORA LM 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet Parasitol*, 111, 143-152.

PESCADOR CA, CORBELLINI LG, OLIVEIRA EC, RAYMUNDO DL, DRIEMEIER D. Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses, Veterinary Parasitology, 150, 1–2,159-163.

PESSOA GA, MARTINI AP, TRENTIN JM, DALCIN VC, LEONARDI CE, VOGEL FS, DE SÁ FILHO MF, RUBIN MI, SILVA CA, 2016. Impact of spontaneous *Neospora caninum*

infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in grazing lactating dairy cows. Theriogenology, 85, 519–527.

PETERS M, LUO TKEFELS E, HECKEROTH AR, SCHARES G. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. International Journal for Parasitology, 31,1144-1148.

PIERGILI FIORETTI D, PASQUALI P, DIAFERIA M, MANGILI V, ROSIGNOLI L, 2003. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, **50**, 399-404.

PIERGILI FIORETTI D, ROSIGNOLI L, RICCI G, MORETTI A, PASQUALI P, POLIDORI GA, 2000. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf : parasitological study and serological follow-up. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, 47**,** 47-53.

PINTO AP, BACHA FB, SANTOS BS, DRIEMEIER D, ANTONIASSI NAB, RIBAS NLKS, LEMOS RAA, 2012. Sheep abortion associated with *Neospora caninum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. Pesq. Vet. Bras. 32:739-742.

PITEL P. H., PRONOST S., CHATAGNON G., TAINTURIER D., FORTIER G., BALLET J. J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France : detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Vet. Parasitol.*, 2001, **10**, 269-277.

POLLO-OLIVEIRA L, POST H, ACENCIO ML, LEMKE N, VAN DEN TOORN H, TRAGANTE V, HECK AJ, ALTELAAR AF, YATSUDA AP, 2013.unravelling the *Neospora caninum* secretome through the secreted fraction (ESA) and quantification of the discharged tachyzoïte using high-resolution mass spectrometry-based proteomics. Parasite vectors, 6, 335.

Q

QIAN W, WANG T, YAN W, ZHANG M, HAN L, XUE R, SONG S, LV C, 2017. Seroprevalence and first multilocus microsatellite genotyping of Neospora caninum in dairy cattle in Henan, central China. Veterinary Parasitology, 244, 81–84.

QUINTANILLA-GOZALO AJ, PEREIRA-BUENO J, SEIJAS-CARBALLEDO A, COSTAS E, ORTEGAMORA LM, 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30**,** 900–906.

QUINTANILLA-GOZALO A, PEREIRA-BUENO J, TABARÉS E, INNES EA, GONZÁLEZ-PANIELLO R, ORTEGA-MORA LM, 1999. Seroprevalence of Neospora caninum infection in dairy and beef cattle in Spain. *International journal for parasitology*, *29*(8), 1201–1208.

R

RÁBAGO-CASTRO JL, JASSO-OBREGÓN JO, ZERTUCHE-RODRÍGUEZ JL, SÁNCHEZ-MARTÍNEZ JG, LOREDO-OSTI J, DOMÍNGUEZ-MUÑOZ MA, 2017. Detection of Neospora caninum antibodies in beef cattle in Tamaulipas, Mexico. Case report. Austral Journal of Veterinary Sciences, 49, 205–207.

RAGHUPATHY R, 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. Immunol Today, 18**,** 478-82.

RAHAL O, AISSAOUI C, HALBOUCHE M, 2013. Ressources Génétique animale en Algérie. 11èmes journées internationales des sciences vétérinaires, p11.

RAZMI GR, MALEKI M, FARZANEH N, TALEBKHAN GAROUSSI M, FALLAH A, H. First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area. Iran. Parasitol. Res., 2007, 100, 755-757.

RAZMI GR, MOHAMMADI GR, GARROSI T, FARZANEH N, FALLAH AH, MALEKI M, 2006. "Seroepidemiology of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Mashhad area, Iran." Vet Parasitol 135(2): 187-189.

REGIDOR-CERRILLO J, ARRANZ-SOLIS D, BENAVIDES J, GOMEZ-BAUTISTA M, CASTRO- HERMIDA JA, MEZO M, PEREZ V, ORTEGA-MORA LM, GONZALEZ-WARLETA M, 2014. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. Vet Res, 45, 10.

REGIDOR-CERRILLO J, GOMEZ-BAUTISTA M, PEREIRA-BUENO J, ADURIZ G, NAVARRO-LOZANO V, RISCO-CASTILLO V, FERNANDEZ-GARCIA A, PEDRAZA-DIAZ S, ORTEGA-MORA LM, 2008. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. Parasitology 135, 1651-1659.

REICHEL MP, ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA M, GONDIM LF, ELLIS JT, 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *Int J Parasitol*, 43, 133-142.

REICHEL MP, ELLIS JT, 2006. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet Parasitol*, 142, 23-34.

REICHEL MP, MCALLISTER MM, POMROY WE, CAMPERO C, ORTEGA-MORA LM, ELLIS JT, 2014. Control options for *Neospora caninum*-is there anything new or are we going backwards? *Parasitology*, 141, 1455-1470.

REICHEL MP, ELLIS JT, DUBEY JP, **2007**. Neosporosis and hammondiosis in dogs. J Small Anim Pract 48, 308-312.

REICHEL MP, MCALLISTER MM, POMROY WE, CAMPERO C, ORTEGA-MORA LM, ELLIS JT, 2014. Control options for *Neospora caninum*-is there anything new or are we going backwards? Parasitology 141, 1455-1470.

REICHEL MP, ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA M, GONDIM LF, ELLIS,JT, 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion-dollar question? International journal for parasitology 43, 133-142.

REID AJ, VERMONT SJ, COTTON JA, HARRIS D, HILL-CAWTHORNE GA, KONEN- WAISMAN S, LATHAM SM, MOURIER T, NORTON R, QUAIL MA, SANDERS M, SHANMUGAM D, SOHAL A, WASMUTH JD, BRUNK B, GRIGG ME, HOWARD JC, PARKINSON J, ROOS DS, TREES AJ, BERRIMAN M, PAIN A, WASTLING JM, 2012. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. PLoSPathog, 8, e1002567.

REITT K, HILBE M, VOEGTLIN A, CORBOZ L, HAESSIG M, POSPISCHIL A, 2007. Aetiology of bovine abortion in Switzerland from 1986 to 1995-a retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and Toxoplasma gondii by PCR. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 54, 15-22.

RICHTER J, ROSENBERGER G, AEHNELT E, GÖTZE R, TIERGEBURTSHILFE 1978. 3rd ed.; Parey: Berlin, Germany,; ISBN 3489733169.

RINALDI L, FUSCO G, MUSELLA V, VENEZIANO V, GUARINO A, TADDEI R, CRINGOLI G, 2005. *Neospora caninum* in pastured cattle : determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. *Vet. Parasitol.*, 128**,** 219-30.

RISCO-CASTILLO V, FERNANDEZ-GARCIA A, ZABALLOS A, AGUADO-MARTINEZ A, HEMPHILL A, RODRIGUEZ-BERTOS A, ALVAREZ-GARCIA G, ORTEGA-MORA LM, 2007. Molecular characterisation of BSR4, a novel bradyzoite-specific gene from *Neospora caninum*. Int J Parasitol, 37, 887-896.

RISCO-CASTILLO V, MARUGAN-HERNANDEZ V, FERNANDEZ-GARCIA A, AGUADO-MARTINEZ A, JIMENEZ-RUIZ E, RODRIGUEZ-MARCO S, ALVAREZ-

GARCIA G, ORTEGA-MORA LM, 2011. Identification of a gene cluster for cell-surface genes of the SRS superfamily in *Neospora caninum* and characterization of the novel SRS9 gene. Parasitology, 138,1832-1842.

RODRIGUES AA, GENNARI SM, AGUIAR DM, SREEKUMAR C, HILL DE, MISKA KB, VIANNA MC, DUBEY JP, 2004. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (Bubalus bubalis) from Brazil. Veterinary parasitology 124, 139-150.

RODRIGUEZ I, CHOROMANSKI L, RODGERS SJ, WEINSTOCK D, 2002. Survey of *Neospora caninum* antibodies in dairy and beef cattle from five regions of the United States. *Vet. Ther*, 3, 396-401.

ROELANDT S, VAN DER STEDE Y, CZAPLICKI G, VAN LOO H, VAN DRIESSCHE E, DEWULF J, HOOYBERGHS J, FAES C, 2015. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a Bayesian evaluation of two antibody ELISA tests for in vivo diagnosis in purchased and abortion cattle. Vet Rec, 176, 598.

ROJO-MONTEJO S, COLLANTES-FERNÁNDEZ E, REGIDOR-CERRILLO J, ALVAREZ-GARCÍA G, MARUGAN-HERNÁNDEZ V, PEDRAZA-DÍAZ S, BLANCO-MURCIA J, PRENAFETA A, ORTEGA-MORA LM, 2009b. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. Veterinary parasitology 159, 7-16.

ROJO-MONTEJO S, COLLANTES-FERNANDEZ E, PEREZ-ZABALLOS F, RODRIGUEZ-MARCOS S, BLANCO-MURCIA J, RODRIGUEZ-BERTOS A, PRENAFETA A, ORTEGA-MORA LM, **2013**. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. *Vet Res*, 44, 106.

ROMAND S, THULLIEZ P, DUBEY JP, 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res*, 84, 50-53.

ROMERO JJ, PEREZ E, DOLZ G, FRANKENA K, 2002. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev. Vet. Med.*,, **53**, 263-273.

ROMERO-SALAS D, GARCIA-VÁZQUEZ Z, MONTIEL-PALACIOS F, MONTIEL PEÑA T, AGUILAR-DOMINGUEZ M, MEDINA-ESPARZA L, CRUZ-VÁZQUEZ C., 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* Anti-bodies in cattle in Veracruz, Mexico, Journal of Animal and Veterinary Advance, 9,1445–1451.

ROSBOTTOM A, GIBNEY EH, GUY CS, KIPAR A, SMITH RF, KAISER P, TREES A J, WILLIAMS DJ, 2008. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected

with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. Infect Immun, 76**,** 2352-61.

ROSBOTTOM A, GUY, CS, GIBNEY EH, SMITH RF, VALARCHER JF, TAYLOR G, WILLIAMS DJ, 2007. Peripheral immune responses in pregnant cattle following Neospora caninum infection. Parasite Immunol, 29**,** 219-28.

RTEGA YR, TORRES MP, MENA KD, 2007. Presence of *Neospora caninum* specific antibodies in three dairy farms in Georgia and two in Texas. Veterinary Parasitology, 144, 353–355.

S

SADELER M. La population bovin dans le département de Constantine : état actuel de l'élevage, orientation à lui donner. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 1931, 118p.

SADREBAZZAZ A, HADDADZADEH H, ESMAILNIA K, HABIBI G, VOJGANI M, HASHEMIFESHARAKI R, 2004. Serological prevalence of Neospora caninum in healthy and aborted dairy cattle in Mashhad, Iran. Vet. Parasitol. 124, 201–204.

SAGER H, FISCHER I, FURRER K, STRASSER M, WALDVOGEL A, BOERLIN P, AUDIGÉ L, GOTTSTEIN B, 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol*., 102(1-2): 1-15.

SAGER H, GLOOR M, BJÖRKMAN C, KRITZNER S, GOTTSTEIN B, 2003. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum tachyzoïte* antigen IgG avidity ELISA. *Vet. Parasitol.*, 112,1-10.

SALEHI N, HADDADZADEH HR, SHAYAN P, VODJGANI M, BOLOURCHI M, 2010. Serological study of in pregnant dairy cattle in Tehran, Iran. Int. J. Vet. Med. Res. Rep. 4, 113–116.

SANCHEZ G. F., MORALES S. E., MARTINEZ M. J., TRIGO J. F., 2003. Determination and correlation of anti- *Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can. J. Vet. Res*, 67, 142-145.

SÁNCHEZ S, CLARK EG, WOBESER GA, JANZEN ED, PHILIBERT H, **2013**. A retrospective study of non-suppurative encephalitis in beef cattle from Western Canada. Can Vet J ; 54: 1127-1132.

SANDERSON MW, GAY JM, BASZLER TV, 2000. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the Northwestern United States. Vet. Parasitol., 90(1-2): 15-24.

SANHUEZA JM, HEUER C, WEST D, 2013. Contribution of Leptospira, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Prev. Vet. Med*., 112(1-2): 90-98.

SANTIN API, JULIANO RS, SILVA AC, OLIVEIRA VSF, JUNQUEIRA-KIPNIS AP, BRITO WMED, FIORAVANTI, MCS, 2017. Soroepidemiologia de *Neospora caninum* e Toxoplasma gondii em bovinos da raça curraleiro. Ciência Animal Brasileira, 18, e-44649.

SANTOS DSD, ANDRADE MP, VARASCHIN MS, GUIMARÃES AM, HIRSCH C. 2011. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *20*(4), 281-288.

SATTARI A, MOSHIRI F, MOUSAVI SGH, 2011. The Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle herds in Golestan province, Iran. J. Vet. Microbiol. 7,

SAWADA M, KONDO H, TOMIOKA Y, PARK C, MORITA T, SHIMADA A, UMEMURA T, 2000. Isolation of Neospora caninum from the brain of a naturally infected adult dairy cow. Veterinary parasitology 90, 247-252.

SCHARES G, BARWALD A, STAUBACH C, SONDGEN P, RAUSER M, SCHRODER R, PETERS M, WURM R, SELHORST T, CONRATHS FJ, 2002a. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol*, **106**, 293-305.

SCHARES G, PETERS M., WURM R., BARWALD A., CONRATHS FJ, 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. Vet. Parasitol**,** 80, 87-98.

SCHARES G, BARWALD A, STAUBACH C, WURM R, RAUSER M, CONRATHS FJ, SCHROEDER C, **2004.** Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet Parasitol*, 120, 55-63.

SCHARES G, BARWALD A, STAUBACH C, ZILLER M, KLOSS D, WURM R, RAUSER M, LABOHM R, DRAGER K, FASEN W, HESS RG, CONRATHS FJ, 2003. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression. *Int J Parasitol*, 33, 1631-1640.

SCHARES G, CONRATHS FJ, REICHEL MP,1999. Bovine neosporosis : comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int. J. Parasitol.*, 29, 659-667.

SCHARES G, DUBREMETZ JF, DUBEY JP, BÄRWALD A, LOYENS A, CONRATHS FJ, 1999a. *Neospora caninum* : identification of 19, 38, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. *Exp. Parasitol.*, 92**,** 109-19.

SCHARES G, PETERS M, WURM R, BARWALD A, CONRATHS FJ, **1998**. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet. Parasitol.*,1998, , 87-98.

SCHARES GA, BA¨RWALD C, STAUBACH M, ZILLER D, KLO¨SS R, SCHRODER R, LABOHM K, DRA¨GER W, FASEN RG, HESS FJ, CONRATHS, 2004. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. Parasitology 129:301–309.

SCHARES, G., HEYDORN, A. O., CUPPERS, A., CONRATHS, F. J. ANDMEHLHORN, H. 2001. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. Parasitology Research, 87(10), 808-816.

SCHNORR B, KRESSIN M, 2001. Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch, 4th ed.; Enke: Stuttgart, Germany, ISBN 3777317942.

SCHULTZ RD, DUNNE HW, HEIST CE, 1973. Ontogeny of the bovine immune response. Infect Immun, 7**,** 981-91.

SEMANGO G, HAMILTON CM, KREPPEL K, KATZER F, KIBONAT, LANKESTER F, ALLAN KJ, THOMAS KM, CLAXTON JR, INNES EA, SWAI E, BUZA J, CLEAVELAND S, DE GLANVILLE WA, 2019. The seroepidemiology of *Neospora caninum* in cattle in Northern Tanzania. *Front. Vet. Sci*., 6(1): 327.

SENOGLES DR, PAUL PS, JOHNSON DW, MUSCOPLAT CC, 1979. Ontogeny of T cells, B cells and monocytes in the bovine foetus. Clin. Exp. Immunol, 36**,** 299-303.

SERRANO-MARTINEZ E, COLLANTES-FERNANDEZ E, CHAVEZ-VELASQUEZ A, RODRIGUEZ- BERTOS A, CASAS-ASTOS E, RISCO-CASTILLO V, ROSADIO-ALCANTARA R, ORTEGA-MORA LM (2007a). Evaluation of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) aborted foetuses from Peru. *Vet Parasitol*, 150, 39-45.

SHARMA S, BAL MS, MEENAKSHI KAUR K, SANDHU KS, DUBEY JP, **2008**. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs in India. *J. Parasitol.*, 94**,** 303-4.

SHIVAPRASAD HL, ELY R, DUBEY JP, 1989 A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet. Parasitol.*, **34,** 145-8.

SINNOTT FA, MONTE LG, COLLARES TF, DE MATOS BM, PACHECO DB, BORSUK S, ANDREOTTI R., HARTLEBEN CP, 2015. Blocking ELISA using recombinant NcSRS2 protein for diagnosing bovine neosporosis. Curr Microbiol, 70, 429-432.

SINNOTT FA, MONTE LG, COLLARES TF, SILVEIRA RM, BORSUK S, 2017. Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011-2016). *Vet Parasitol*, 239, 19-25.

SNAK A, GARCIA FG, LARA AA, PENA HFJ, OSAKI SC, 2018. *Neospora caninum* in properties in the west region of Paran´a, Brazil: prevalence and risk factors. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 27, 51–59.

SOETE M, CAMUS D, DUBREMETZ JF, 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. Experimental parasitology 78, 361-370.

SOETE M, FORTIER B, CAMUS D, DUBREMETZ JF, 1993. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. Experimental parasitology 76, 259-264.

SPEER CA, DUBEY JP, **1989**. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. J Protozool 36, 458-463.

ŠPILOVSKÁ S, REITEROVÁ K, ANTOLOVÁ D, 2015. *Neospora caninum*- associated abortions in Slovak dairy farm. Iranian Journal of Parasitology, 10, 96–101.

STAHL K, BJORKMAN C, EMANUELSON U, RIVERA H, ZELADA A, MORENO-LOPEZ J, 2006. A prospective study of the effect of *Neospora caninum* and BVDV infections on bovine abortions in a dairy herd in Arequipa, Peru. *Prev Vet Med*, 75, 177-188.

STENLUND S, KINDAHL H, MAGNUSSON U, UGGLA A, BJORKMAN C, 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, **85**, 227-234.

SUTEERAPARP P, PHOLPARK S, PHOLPARK M, CHAROENCHAI A, CHOMPOOCHAN T, YAMANE I, KASHIWAZAKI Y. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. *Vet. Parasitol.*, 1999, 86**,** 49-57.

SWIFT BL, KENNEDY PC, 1972. Experimentally induced infection of in utero bovine fetuses with bovine parainfluenza 3 virus. Am J Vet Res, 33, 57-63.

T

THILSTED JP, DUBEY JP, 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J. Vet. Diagn. Invest., 1, 205-209.

THRUSFIELD M. 2007. Veterinary Epidemiology, 3rd edn., Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. pp. 230–238.

THURMOND MC, HIETALA SK, 1997. Effect of Neospora caninum infection on milk production in firstlactation dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc., 210, 672-674.

THURMOND MC, et HIETALA SK, 1996. Culling associated with Neospora caninum infection in dairy cows. Am. J. Vet. Res., 57:1559–1562.

TOMA B, DUFOUR B, SANAA M, BENEET JJ, SHAW A, MOUTOU F, LOUZA A, 2001. Epidémiologie appliquée à la lutte contre les maladies animales transmissibles majeures. AEEMA, Maison-Alfort, France, 696p.

TORPIER G, CHARIF H, DARCY F, LIU J, DARDE ML, CAPRON A, 1993. Toxoplasma gondii: differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. Exp Parasitol, **77**, 13-22.

TREES AJ, GUY F, LOW JC, ROBERTS L, BUXTON D, DUBEY JP, 1994. Serological evidence implicating Neospora species as a cause of abortion in British cattle. *Vet. Rec.*, 134, 405-7.

TREES AJ, MC ALLISTER MM, GUY CS, MC GARRY JW, SMITH RF, WILLIAMS DJ, **2002**. *Neospora caninum* : oocyst challenge of pregnant cows. Vet. Parasitol., 109, 147-154.

TREES AJ, DAVISON HC, INNES EA, WASTLING JM, 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. Int. J. Parasitol., 29:1195–1200.

TUEMMERS C, VALENZUELA G, NUÑEZ C, DE LA CRUZ R, MEYER J , ANDAUR, M, LEYAN P, MORA C, 2017. Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos de una Feria Ganadera de la Región de la Araucanía, Chile. Revista de Pesquisas Veterinárias do Peru, 28, 629–635.

TUNEV SS, MCALLISTER MM, ANDERSON-SPRECHER RC, WEISS LM, 2002. Neospora caninum in vitro: evidence that the destiny of a parasitophorous vacuole depends on the phenotype of the progenitor zoite. J Parasitol, 88, 1095-1099.

U

UGGLA A, MATTSSON JG, LUNDÉN A, JAKUBEK EB, NÄSLUND K, HOLMDAHL OJM, 2000. *Neospora caninum* in Sweden. International Journal for Parasitology, 30: 893-6., **30:** 393-6.

UGGLA A., BUXTON D, 1990. Immune responses against *Toxoplasma* and Sarcocystis infections in ruminants : diagnosis and prospects for vaccination. *Rev. Sci. Tech.*, 1990, **9,** 441-62.

UGGLA A, STENLUND S, HOLMDAHL OJM, JAKUBEK EB, THEBO P, KINDAHL H, BJÖRKMAN C, **1998**. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. Int. J. Parasitol., **28**, 1467-1472.

UNJIT K, **2018**. The effects of development and virulence on gene expression in the protozoan parasite Neospora caninum. Doctoral thesis University of Liverpool.

UTEU O, PA TIU A, GYÖRKE A, BORZA G, ARDELEAN A, COZMA V. A survey of Neospora caninum-associated abortion in dairy cattle of Romania. Sci Parasitol 2013; 14: 139-146.

UZEDA RS, SCHARES G, ORTEGA-MORA LM, MADRUGA CR, AGUADO-MARTINEZ A, CORBELLINI LG, DRIEMEIER D, GONDIM LF, 2013. Combination of monoclonal antibodies improves immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*. Vet Parasitol, 197, 477-486.

V

VACLAVEK P, KOUDELA B, MODRY D, SEDLAK K, 2003. Seroprevalence of *Neospora caninum* in aborting dairy cattle in the Czech Republic. Vet. Parasitol., 2003, 115, 239-245.

VANLEEUWEN JA, HADDAD JP, DOHOO IR, KEEFE GP, TIWARI A, SCOTT HM, 2010 . Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Prev Vet Med*, 93, 129-138.

VENTURINI MC, VENTURINI L, BACIGALUPE D, MACHUCA M, ECHAIDE I, BASSO W, UNZAGA JM, DI LORENZO C, GUGLIELMONE A, JENKINS MC, DUBEY JP, 1999. *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.*, 29, 705-1708.

VON BLUMRO¨DER D, SCHARES G, NORTON R, WILLIAMS DJL, ESTEBAN-REDONDO I, WRIGHT S, BJO¨RKMAN C, FRO¨SSLING J, RISCO-CASTILLO V,

FERNA ´NDEZ-GARCI´A, ORTEGA-MORA LM, SAGER H, HEMPHILL A, VAN MAANEN C, WOUDA W, CONRATHS FJ, 2004. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. Vet. Parasitol. 120:11–22.

VON BLUMRÖDER D, STAMBUSCH R, LABOHM R, KLAWONN W, DRA¨GER K, FASEN W, CONRATHS FJ, SCHARES G, 2006. Potential risk factors for the serological detection of *Neospora caninum* infections in cattle in Rhineland-Palatinate (Germany). *Tierärztl. Prax.G*, 34, 141–147.

VONLAUFEN N, GUETG N, NAGULESWARAN A, MULLER N, BJORKMAN C, SCHARES G, VON BLUMROEDER D, ELLIS J, HEMPHILL A, 2004. In vitro induction of Neospora caninum bradyzoites in Vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. Infect Immun, 72, 576-583.

VONLAUFEN N, MULLER N, KELLER N, NAGULESWARAN A, BOHNE W, MCALLISTER MM, BJORKMAN C, MULLER E, CALDELARI R, HEMPHILL A, 2002. Exogenous nitric oxide triggers Neospora caninum tachyzoite-to-bradyzoite stage conversion in murine epidermal keratinocyte cell cultures. International journal for parasitology 32, 1253-1265.

VONLAUFEN N, GUETG N, NAGULESWARAN A, MÜLLER N, BJÖRKMAN C, SCHARES G, VON BLUMRÖDER D, ELLIS J, HEMPHILL A, 2004. *In vitro* induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of *tachyzoïte*s and bradyzoites. *Infect. Immun.*, **72,** 576-83.

W

WALDNER CL, JANZEN ED, RIBBLE CS, 1998. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J*

WALDNER CL, HENDERSON J, WU JTY, BREKER K, CHOW EYW 2001. Reproductive performance of a cow-calf herd following a Neospora caninum-associated abortion epidemic. Can. Vet. J., 2001, 42, 355–360.

WANG J, TANG D, LI W, XU J, LIU Q, LIU J, 2017. A new micronème protein of Neospora caninum, NcMIC8 is involved in host cell invasion. Exp Parasitol, 175, 21-27.

WAPENAAR W, BARKEMA HW, VANLEEUWEN JA, MCCLURE JT, O'HANDLEY RM, KWOK OC, THULLIEZ P, DUBEY JP, JENKINS MC 2007a. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol*, **143**, 166-173.

WAPENAAR W, BARKEMA HW, O'HANDLEY RM, BARTELS CJ, **2007a.** Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in bulk milk to estimate the prevalence of *Neospora caninum* on dairy farms in Prince Edward Island, Canada. *Can Vet J*, 48,493-499.

WASMUTH JD, PSZENNY V, HAILE S, JANSEN EM, GAST AT, SHER A, BOYLE J P, BOULANGER MJ, PARKINSON J, GRIGG ME, 2012. Integrated bioinformatic and targeted deletion analyses of the SRS gene superfamily identify SRS29C as a negative regulator of Toxoplasma virulence. MBio, 3, e00321-12.

WEBER FH, JACKSON JA, SOBECKI B, CHOROMANSKI L, OLSEN M, MEINERT T, FRANK R, REICHEL MP, ELLIS JT, 2013. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of *Neospora*-associated fetal loss in cattle. *Clin Vaccine Immunol*, 20, 99-105.

WEISS LM, MA YF, HALONEN S, MCALLISTER MM, ZHANG YW, 1999. The in vitro development of Neospora caninum bradyzoites. Int J Parasitol, **29**, 1713-1723.

WESTON JF, HEUER C, WILLIAMSON NB, 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev Vet Med*, 103, 136-144.

WESTON JF, WILLIAMSON NB, POMROY WE, **2005**. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. N. Z. Vet. J., 53**,** 142-8.

WILLIAMS D J, GUY CS, MCGARRY JW, GUY F, TASKER L, SMITH RF, MACEACHERN K, CRIPPS PJ, KELLY DF TREES AJ 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. Parasitology, 121 (Pt 4)**,** 347-358.

WILLIAMS DJ, GUY CS, SMITH RF, ELLIS J, BJORKMAN C, REICHEL MP, TREES AJ, 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect Immun*, 75, 1343-1348.

WILLIAMS DJ, MCGARRY J, GUY F, BARBER J, TREES AJ, **1997.** Novel ELISA for detection of Neosporaspecific antibodies in cattle. *Vet. Rec.*, 1997, 140, 328-331.

WOUDA W , 2000. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. Vet. Q., 22(2),71-74.

WOUDA W, DIJKSTRA T, KRAMER AMH, VAN MAANEN C, BRINKHOF JMA, 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. Int. J. Parasitol. 29**:**1677–1682.

WOUDA W, DUBEY JP, JENKINS MC, 1997. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol*, 83, 545-547.

WOUDA W, BRINKHOF J, VAN MAANEN C, DE GEE AL, MOEN AR, 1998. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds : A comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, 5**,** 711-6.

WU JT, DREGER S, CHOW EY, BOWLBY EE, 2002. Validation of 2 commercial *Neospora caninum* antibody enzyme linked immunosorbent assays. *Can. J. Vet. Res.*, **66**, 264-271.

Y

YAEGER MJ, SHAWD-WESSELS S, LESLIE-STEEN P, **1994**. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 6:506- 508.

YBANEZ RH, TERKAWI MA, KAMEYAMA K, XUAN X, NISHIKAWA Y, **2013**. Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for serodiagnosis of Neospora caninum infection. Clin Vaccine Immunol, 20, 1617-1622.

YILDIZ K, GÖKPINAR S, SÜRSAL N, DEĞIRMENCI R, 2017. Seroprevalence of Neospora caninum in dairy cattle raised in Çiçekdağı District of Kırşehir Province. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 41, 135–138.

YILDIZ K, KUL O, BABUR C, KILIC S, GAZYAGCI AN, CELEBI B, GURCAN B, 2009. 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. 164, 306-310.

YIN J, QU G, CAO L, LI Q, FETTERER R, FENG X, LIU Q, WANG G, QI D, ZHANG X, MIRAMONTES E, JENKINS M, ZHANG N, TUO W, 2012. Characterization of Neospora caninum microneme protein 10 (NcMIC10) and its potential use as a diagnostic marker for neosporosis. Vet Parasitol, 187, 28-35.

Z

ZEMMOUCHI F, **2009**. Ostéométrie des métapodes bovins. Thèse de doctorat : médecin vétérinaire. Constantine : Université Mentouri de Constantine 219p.

ZHANG W, DENG C, LIU Q, LIU J, WANG M, TIAN KG, YU XL, HU DM, 2007. First identification of *Neospora caninum* infection in aborted bovine foetuses in China. *Veterinary parasitology*, *149*(1-2), 72–76.

Annexe 1 : Guide d'utilisation du kit ELISA IDvet

IDvet
Innovative Diagnostics

Système de management certifié

ID Screen®
Neospora caninum indirect

ELISA indirect pour la détection des anticorps dirigés contre *N. caninum* dans le sérum, le plasma ou les échantillons de lait de bovins, ovins ou caprins

Usage *in vitro*

Août 2018

- Conjugué multi-espèce remplacé par un conjugué anti-ruminant
- Modification du facteur de dilution des échantillons de lait (pur au lieu de dilué au 1/2)

NCS ver 0818 FR

IDvet, 310, rue Louis Pasteur – Grabels - FRANCE
Tel:+ 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95
www.id-vet.com - E-mail: info@id-vet.com

Information Générale

Ce kit de diagnostic est destiné à la mise en évidence d'anticorps spécifiques de *Neospora caninum* dans les sérums, plasmas ou laits de bovins, ovins et caprins.

Le test utilise un conjugué anti-ruminant.

Description et Principe

Les puits sont sensibilisés avec de l'extrait antigénique purifié de *Neospora caninum*.

Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les puits. Les anticorps spécifiques de *Neospora*, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps.

Après lavage, un conjugué anti-ruminant marqué à la peroxydase (HRP) est distribué dans les puits. Il se fixe aux anticorps anti-*Neospora*, formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-HRP.

Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB).

La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester :

- en présence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage
- en l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration

La lecture est réalisée à 450 nm.

Composants du kit

Réactifs*
Microplaques sensibilisées avec un extrait d'antigène purifié de *Neospora caninum*
Conjugué concentré (10X)
Contrôle Positif
Contrôle Négatif
Tampon de dilution 2
Tampon de dilution 3
Solution de lavage concentrée (20X)
Solution de révélation
Solution d'arrêt (0,5 M)

** La composition du kit est indiquée sur l'étiquette de dessus de kit.*

1. Le conjugué, les contrôles, et la solution de révélation doivent être stockés à 5°C (± 3°C).
2. Les autres réactifs peuvent être stockés entre +2°C et +26°C.
3. Les solutions de lavage concentrées, de révélation et d'arrêt peuvent être utilisées dans l'ensemble de la gamme IDvet. Les tampons de dilution portant les mêmes numéros de lot sont interchangeables.

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Pipettes de précision mono ou multi-canaux capables de délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl et 500 µl.
2. Embouts de pipette à usage unique.
3. Eau distillée ou désionisée.
4. Plaque de pré-dilution format 96 puits.
5. Système de lavage manuel ou automatique.
6. Lecteur de microplaques à 96 puits.

Remarques et précautions d'emploi

1. Ne pas pipeter à la bouche.
2. Contient des composants pouvant être nocifs pour la peau et les yeux et pouvant entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. Eviter le contact avec la peau et les yeux. Utiliser une blouse de laboratoire protectrice, des gants à usage unique et des lunettes de sécurité. La solution d'arrêt (acide 0,5 M) peut être nocive en cas d'ingestion.
3. Ne pas exposer la solution de révélation à une lumière vive ni à des agents oxydants.
4. Tous les réactifs doivent être décontaminés avant élimination. Eliminer les produits conformément à la réglementation en vigueur.

Pour plus d'informations, veuillez-vous référer à la fiche de données de sécurité, disponible sur demande.

Préparation des échantillons

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

Préparation de la Solution de lavage

Si nécessaire, ramener la Solution de lavage concentrée **(20X)** à température ambiante (21°C ± 5°C) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux.

Préparer la Solution de lavage **(1X)** par dilution au 1/20ème de la Solution de lavage **(20X)** dans de l'eau distillée/désionisée.

La qualité de l'étape de lavage peut impacter les résultats. S'assurer que les puits soient complètement vides entre les lavages. En cas d'utilisation d'un laveur automatique, il est crucial de paramétrer correctement l'appareil (mode, type et hauteur d'aspiration). Pour plus d'information, veuillez consulter le "Guide de Lavage IDvet", disponible sur demande à info@id-vet.com.

Mode opératoire

Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C ± 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

SERUM OU PLASMA :

Les échantillons et les contrôles sont testés à une dilution au 1/10 dans le Tampon de dilution 2.

1. Dans la microplaque ELISA, distribuer :
   - 90 µl de **Tampon de dilution 2** dans chaque puit.
   - 10 µl de **Contrôle Négatif** dans les puits A1 et B1.
   - 10 µl de **Contrôle Positif** dans les puits C1 et D1.
   - 10 µl de chaque échantillon à tester dans les puits restants.
2. Couvrir la plaque et **incuber 45 min ± 4 min** à 21°C (± 5°C).

LAIT :

Ce test peut être réalisé sur des échantillons de lait entier ou écrémé, avec ou sans conservateurs.

Lorsque des laits entiers sont testés, des précautions particulières de lavage doivent être prises (Guide « Recommandations pour les tests sur lait » disponible sur demande).

Centrifuger les échantillons de lait entier ou les laisser reposer afin que la crème se sépare du lactosérum (crème au-dessus et lactosérum en dessous). Pipeter sous la crème afin de ne prélever que le lactosérum (le lactosérum contient les anticorps).

1. Les échantillons sont testés purs et les contrôles à une dilution finale au 1/30 ainsi :

   a) Pré-diluer le **Contrôle Négatif** et le **Contrôle Positif au 1/30** dans le **Tampon de dilution 2**.

   b) Dans la microplaque ELISA, distribuer :
   - 100 µl du **Contrôle Négatif** pré-dilué dans les puits A1 et B1.
   - 100 µl du **Contrôle Positif** pré-dilué dans les puits C1 et D1.
   - 100 µl de chaque échantillon à tester dans les puits restants.
2. Couvrir la plaque et incuber **45 min ± 4 min** à 21°C (± 5°C).

POUR TOUS LES PROTOCOLES :

3. Vider les puits. Laver chaque puits 3 fois avec au minimum 300 µl de **solution de lavage**. Eviter le dessèchement des puits entre les lavages. *Pour les échantillons de lait, attention à ce qu'il n'y ait pas un cercle blanc dans les puits après le lavage. Pour éviter les résidus de graisse, il est possible de laisser un temps de contact de 2 - 5 minutes entre chaque lavage.*
4. Préparer le **Conjugué 1X** en diluant le **Conjugué 10X** au **1/10ème** en **Tampon de dilution 3.**
5. Distribuer 100 µl de **Conjugué 1X** dans chaque puits.
6. Couvrir la plaque et **incuber 30 min ± 3 min** à 21°C (± 5°C).
7. Vider les puits. Laver chaque puits 3 fois avec au minimum 300 µl de **solution de lavage**. Eviter le dessèchement des puits entre les lavages.
8. Distribuer 100 µl de **Solution de révélation** dans chaque puits.
9. Couvrir la plaque et incuber **15 min ± 2 min** à 21°C (± 5°C) à l'obscurité.
10. Distribuer 100 µl de **Solution d'arrêt** dans chaque puits, en suivant le même ordre qu'en étape N°8, pour arrêter la réaction.
11. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Activer Windo
Accédez aux paran

Annexe 2 : Informations sur les tissus placentaires et fœtales prélevé pour l'analyse histoplatologie

Parasitic host : Bovine fetus		
collection place : Souk Ahras -Algeria		
Total number of samples : 239		
Identification		
Fetus 1	**Sex**	**Femal**
	Age	**4 and a half months**
	Number of samples/fetus	**8**
	Name of the samples	**–1 liver= (1L)** **–1Cotyledon= (1Co)** **– 1Brain = (1B)** **– 1Skeletal muscle= (1SM)** **–1Lung = (1P)** **–1Kideny= (1K)** **–1Brain= (1B)** **–1 Heart = (1H)**
Fetus 2	**Sex**	**Femal**
	Age	**6months**
	Number of samples/fetus	**10**
	Name of the samples	**–2 liver= (2L)** **–2brain = (2B)** **–2skeletal muscle= (2SM)** **–2spleen = (2S)** **–2 lung= (2P)** **–2kideny = (2k)** **–2Skeletal muscle= (2SM)** **– 2Heart= (2H)** **–2gonglion = (2G)= (lymph node)** **–2kideny= (2K)**
Fetus3	**Sex**	**Femal**
	Age	**3months**
	Number of samples/fetus	**8**
	Name of the samples	**–3liver= (3L)** **–3skeletal muscle=(SM)** **–3brain= (3B)**

		–3heart=3H –3lung= (3P) –3kidney= (3k) –3spleen= (3S) –3cotyledon= (3Co)
Fetus 4	Sex	Femal
	Age	4 months
	Number of samples	8
	Name of the samples/fetus	–4heart= (4H) –4liver= (4L) –4lung= (4P) –4skeletal muscle= (4SM) –4spleen= (4S) –4brain= (4B) –4 kidney = (4k) –4colyledon= (4Co)
Fetus 5	Sex	Male
	Age	5 months
	Number of samples/fetus	10
	Name of the samples	–5liver= (5L) –5spleen= (5S) – 5 gonglion= (lymph node), –5 skeletal muscle= (5SM) –5thymus= (5T) –5cotyledon= (5Co) –5brain=(5B) – 5 heart=(5H) –5 kidney=(5K) –5lung=(5P)
Fetus 6	Sex	Male
	Age	2 and a half months
	Number of samples/fetus	7
	Name of the samples	–6kidney ,= (6K) – 6liver,=(6L) –6brain,=(6L) –6lung, =(6P) –6heart, =(6H) –6skeletal Muscle =(6SM) –6 cotyledon.=(6C)
	Sex	Male

Fetus 7	**Age**	**8 months**
	Number of samples/fetus	**2**
	Name of the samples	**–7 brain, =(7B)** **–7 cerebelum.=(7Cerv)**
Fetus 8	**Sex**	**8months**
	Age	**Male**
	Number of samples/fetus	**6**
	Name of the samples	**–8skeletal muscle, =(8SM)** **–8lung,=(8P)** **–8heart, =(8H)** **–8liver, =(8L)** **–8 spleen,=(8S)** **–8kidney.=(8K)**
Fetus9	**Sex**	**male**
	Age	**5and a half months**
	Number of samples/fetus	**8**
	Name of the samples	**–9 lung =,(9P)** **– 9brain,= (9B)** **–9 Skeletetal muscle=(9SM)** **–9spleen=, (9S)** **–9kidney =,(9K)** **–9 thymus,= (9T)** **–9heart,= (9H)** **–9liver=.(9L)**
Fetus 10	**Sex**	**femal**
	Age	**8 months**
	Number of samples/fetus	**9**
	Name of the samples	**–10brain, =(10B)** **–10 gonglion=(10G)** **–10 liver, =(10L)** **–10lung, =(10P)** **–10kideny,=(10K)** **–10 heart, =(10H)** **–10 spleen,= (10S)** **–10thymus, =(10T)** **–10 skeletal muscle.= (10SM)**
	Sex	**male**

Fetus 11	**Age**	**3 and a half months**
	Number of samples/fetus	**7**
	Name of the samples	**–11 liver,= (11L)** **–11brain,= (11B)** **–11 lung, =(11P)** **–11skeletal muscle, =(11SM)** **–11heart,=(11H)** **– 11 kidney= (11K)** **–11 spleen=(11S)**
Fetus 12	**Sex**	**Femal**
	Age	**4months**
	Number of samples/fetus	**7**
	Name of the samples	**– 12 spleen, =(12S)** **– 12kidney, =(12K)** **– 12 brain=(12B)** **– 12 heart=(12H)** **– 12 liver(12L)** **– 12 skeletal muscle=(12SM)** **– 12 lung=(12P)**
Fetus 13	**Sex**	**/**
	Age	**/**
	Number of samples/fetus	**7**
	Name of the samples	**–13spleen=(13S)** **– 13kidney=(13K)** **–13 skeletal muscle=(13SM)** **–13liver=(13L)** **–13 lung=(13P)** **–13 heart=(13H)** **–13 brain=(13B)**
Fetus 14	**Sex**	**Male**
	Age	**5months**
	Number of samples/fetus	**7**
	Name of the samples	**–14 thymus=(14T)** **– 14 skeletal muscle =(14MS)** **–14kidney=(14K)** **–14liver=(14L)** **–14 heart=(14H)** **–14 lung=(14P)** **–14 brain(14B)**

Fetus 15	**Sex**	**Male**
	Age	**6**
	Number of samples/fetus	**7**
	Name of the samples	**–15liver=(15L) –15 heart=(15H) –15 brain=(15B) –15lung=(15P) –15skeletal muscle=(15SM) – 15spleen =(15S) –15 kideney=(15K)**
Fetus 16	**Sex**	**Male**
	Age	**6months**
	Number of samples/fetus	**8**
	Name of the samples	**–16 thymus=(16T) –16spleen=(16S) –16 kidney=(16K) – 16cotyledon=(16Co) –16lung=(16P) –16 brain=(16B) –16 liver=(16L) –16 heart=(16H)**
Fetus 17	**Sex**	**male**
	Age	**7months**
	Number of samples/fetus	**7**
	Name of the samples	**–17 heart=(17H) –17lung(17P) – 17 skeletal muscle (17SM) –17kidney=(17K) – 17liver=17(17L) –17brain=(17B) –17 spleen=17S)**
Fetus 18	**Sex**	**male**
	Age	**5months**
	Number of samples/fetus	**7**
	Name of the samples	**–18 lung=(18P) –18 spleen(18S) –18 brain=(18B) –18 kidney=(18K)**

		–18 muscle skeletal=(18MS) –18 heart(18H) –18 liver(18L
Fetus 19	Sex	Male
	Age	3and a half months
	Number of samples/fetus	7
	Name of the samples	–19 liver=(19L) –19 brain=(19B) –19 skeletel mucle=(19SM) – 19 kidney=(19k) – 19spleen=(19S) –19 heart=(19H) –19lung=(19P)
Fetus 20	Sex	Male
	Age	6months
	Number of samples/fetus	9
	Name of the samples	–20 Skeletel Muscle=(20SM) –20 brain=(20B) –20kidney=(20K) –20cotyledon=(20Co) –20thymus =(20T) –20lung=(20P) –20heart=(20H) –20spleen=(20S) –20liver=(20L)
Fetus 21	Sex	femal
	Age	5months
	Number of samples/fetus	9
	Name of the samples	–21 skeletal muscle=(21SM) –21 heart=(21H) –21liver=(21L) –21 cotyledon =(21Co) –21kidney=(21K) –21 spleen=(21S) –21thymus=(21T) –21 lung=(21P) –21brain=21B)
	Sex	Male

Fetus 22	**Age**	**5 and a half months**
	Number of samples/fetus	**9**
	Name of the samples	**–22liver=(22L) –22heart=(22H) –22 skeletal muscle= (22SM) –22 lung= (22P) –22 kidney= (22k) –22 lung= (22P) –22 spleen= (22S) –22 brain = (22B) –22 cotyledon=(22Co)**
Fetus 23	**Sex**	**Male**
	Age	**5months**
	Number of samples/fetus	**8**
	Name of the samples	**–23 spleen=(23S) –23 lung=(23P) –23kidney=(23k) –23spleen= (23S) –23liver=(23L) –23 cotyledon =(23Co) –23 heart=(23H) –23 sekeletel muscle=(23SM)**
Fetus 24	**Sex**	**Femal**
	Age	**5and a half months**
	Number of samples/fetus	**9**
	Name of the samples	**–24Spleen=(24S) –24 heart= (24H) –24brain= (24B) –24 liver=(24L) –24 gonglyon (lymph node)=(24G) –24 kidney =(24K) –24 thymus= (24T) –24 skeletel muscle=(24SM) –24lung =(24P)**
Fetus 25	**Sex**	**Male**
	Age	**3and a half months**
	Number of samples/fetus	**8**

	Name of the samples	**–25 heart=(25H) –25brain=(25B) –25 liver=(25L) –25 Coteledon=(25Co) –25 kidney=(25k) –25 spleen=(25S) –25 Skeletel muscle=(25SM) –25lung =(25P)**
Fetus 26	**sex**	**male**
	age	**5 months**
	Number of samples/fetus	**9**
	Name of the samples	**–26Spleen=(26S) –26 heart=(26H) –26brain =(26B) –26 liver=(26L) –26 kidney=(26K) –26 thymus =(26T) –26skeletel muscle=(26SM) –26lung =(26P) –26stomacal liquide=(26Sl)**
Fetus 27	**Sex**	**/ local**
	Age	**5months**
	Number of samples/fetus	**7**
	Name of the samples	**–27Spleen –27 heart –27brain –27 liver –27 kidney –27 skeletel muscle –27lung**
Fetus 28	**Sex**	**/**
	age	**5 and a half months**
	Number of samples/fetus	**11**
	Name of the samples	**–28Spleen –28heart –28brain –28 liver –28 gonglyon (lymph node) –28 kidney –28 thymus**

		–28Intestin –28 Skeletel muscle –28lung –28 Cotyledon
Fetus 29	Sex	/
	age	3 and a half months
	Number of samples/fetus	7
	Name of the samples	–29Spleen –29 heart –29brain –29 liver –29 kidney –29 Skeletel muscle –29lung
Fetus 30	Sex	
	age	3 mounths
	Number of samples/fetus	8
	Name of the samples	–30Spleen –30 heart –30brain –30 liver –30 kidney –30 skeletel muscle –30lung –30 coteyedon

Annexe 3 : Dates clés de la néosporose depuis sa découverte

Année	Evénement marquant	Publications
1957	La maladie existe déjà mais est confondue avec la toxoplasmose.	***DUBEY et al., 1990a***
1984	La maladie est reconnue pour la première fois chez le chien en Norvège	***BJERKAS et al., 1984***
1988	Description de la nouvelle espèce : *Neospora caninum*.	***DUBEY et al., 1988a***
	Induction expérimentale de la maladie chez des chiens et des souris.	***DUBEY et al., 1988b***
1989	Découverte du parasite chez des bovins qui ont avorté.	***THILSTED et DUBEY, 1989***
	Premiers essais de traitement sur culture cellulaire.	***LINDSAY et DUBEY, 1989a***
	Développement de l'immunofluorescence indirecte (IFI), de l'immunohistochimie.	***LINDSAY et DUBEY, 1989b***
1990	Premiers essais de traitement anti-Neospora sur les souris.	***LINDDAY et DUBEY, 1990a***
1991	Neospora caninum est une cause majeure d'avortements dans certains cheptels.	***ANDERSON et al., 1991 ; BARR et al., 1991***
	Démonstration que les chiots norvégiens (1984) étaient bien infectés par *Neospora caninum*.	***BJERKAS et DUBEY, 1991***
1992	Démonstration de la transmission verticale chez les bovins.	***DUBEY et al., 1992***
1993	Développement d'une technique ELISA pour le diagnostic de la néosporose (chiens et bovins).	***PARE et al., 1995***
1995	Séquence nucléotidique identique entre *Neospora caninum* du chien et celui du bovin.	***MARSH et al., 1995***
1996	Développement d'une technique diagnostique par PCR.	***ELLIS, 1998***
1998	Démonstration expérimentale : le chien est un hôte définitif	***MAC ALLISTER et al., 1998***
	Description d'une nouvelle espèce : *Neospora hughesi* chez le cheval.	***MARSH et al., 1998***
	Développement d'un test d'agglutination directe pour le diagnostic	***ROMAND et al., 1998***
2001	Le chien est naturellement hôte définitif.	***BASSO et al., 2001***
2003	Développement de tests ELISA permettant de savoir si l'infection est chronique ou récente.	***BJÖRKMAN et al., 2003***