REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهوريّة الجزائريةّ الدّيمقراطيّة الشّعبيّة

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التّعليم العالي و البحث العلميّ

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE- ALGER

المدرسة الوطنيّة العليا للبيطرة-الجزائر

THESE

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT ES-SCIENCES

SCIENCES VETERINAIRES

THEME

ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES *BRUCELLA* RESPONSABLES DE LA MALADIE ET LEUR DISTRIBUTION EN ALGERIE

Présenté par :

Nedjma LOUNES

Devant le jury composé de :

BEN MAHDI M. H.	**Professeur**	**ENSV Alger**	**Présidente**
BOUKHORS K.	**Professeur**	**ENSV Alger**	**Examinatrice**
AOUN L.	**Professeur**	**U. El Taref**	**Examinatrice**
KORICHI-OUAR M. N.	**Maître de Conférences A**	**IPA**	**Examinatrice**
BOUYOUCEF A.	**Professeur**	**U. Blida I**	**Directeur de thèse**
MICK V.	**Directrice de Recherche**	**ANSES**	**Co-directrice de thèse**

Juin 2016

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements

A Monsieur Bouyoucef A.
Mon directeur de thèse, d'avoir accepté de diriger ce travail et pour la liberté et la confiance qu'il m'a accordées au cours de ces années de thèse, pour ses encouragements et ses conseils.

A Madame Mick V.
Ma co-directrice de thèse, d'avoir pris le relais pour la codirection de ce travail, pour son encadrement exceptionnel durant mes stages à l'ANSES, de m'avoir tant appris sur les MLVA et de m'avoir dirigé durant la rédaction de mon article et de la partie moléculaire de la thèse.

Au Professeur Ben Mahdi M. H.
De m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Profond respect.

Aux Professeurs Boukhors K. et Aoun L.
D'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Au Docteur Korichi-Ouar M. N.
D'avoir accepté de participer à ce jury, pour ses encouragements incessants et de m'avoir ouvert le chemin vers le monde des Brucella.

Au Docteur Boughalem K.
Directeur des services vétérinaires de m'avoir permis et aidé à mettre en place le réseau national vétérinaire, pour la collecte des prélèvements à travers l'Algérie.

Aux Inspecteurs de wilaya et vétérinaires des inspections et abattoirs des wilayas de Blida, Tlemcen, Jijel, El Taref et Laghouat.

Aux vétérinaires des abattoirs de Rouiba, Hussein Dey et El Harrach

Je tiens à remercier tout particulièrement : Dr Benyoucef (IVW de Blida), Dr Abdenabi (Inspection vétérinaire de Bouaarfa), Dr Ghomri (IVW de Tlemcen), Dr Djellal (IVW d'El Taref), Dr Chaker (IVW de Jijel) et Dr Oudjhani (IVW de Laghouat).

Au Professeur Rahal Kh.
Chef de service de Bactériologie Médicale (IPA), de m'avoir ouvert les portes du laboratoire, d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour mes recherches et d'avoir cru en moi. Profonde gratitude.

Au Docteur Tali-Maamar H.
Chef de service de Bactériologie Médicale, de m'avoir permis de terminer mon travail jusqu'au bout au laboratoire et de m'avoir facilité tout.

A Madame Lazri M.
Technicienne au laboratoire de Bactériologie Médicale, d'avoir été toujours à mes côtés, de m'avoir aidé et soutenu durant toutes ces années.

Au Dr Benamrouche N.
Maître Assistante service de Bactériologie Médicale (IPA), de m'avoir toujours orienté et aidé durant mon stage au laboratoire.

A Gilles Le Carrou
Technicien au Laboratoire de Référence des Brucelloses (ANSES), de m'avoir formé à l'isolement et l'identification des Brucella, de m'avoir appris la rigueur et les connaissances nécessaires pour manipuler les Brucella, avec un dévouement et une gentillesse inégalés.

Au Dr Hanoun D.
Médecin épidémiologiste à l'INSP, de m'avoir aidé à faire toute mon analyse statistique et pour sa disponibilité.

A Taibi F.
Maitre assistante à l'ENSV, de m'avoir aidé à réaliser toutes les cartes épidémiologiques des Brucella isolées.

A Zenia S.
Maitre assistante à l'ENSV, de m'avoir aidé dans l'analyse statistique.

A mes étudiants Lylia Hani et Djallal Hamidouche de m'avoir collecté des prélèvements.

Au Dr Redjdal, Dr Cherifi et Dr Benaissa de m'avoir collecté des prélèvements.

A Mohand,
Mon mari qui m'a accompagné aux quatre coins d'Algérie pour mettre en place le réseau vétérinaire et collecter des prélèvements, de m'avoir soutenu tout au long de ces années.

A toutes les personnes que je n'oublie pas qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

A mes très chers parents,

Qui m'ont toujours soutenu et aidé quelques soient les circonstances, dans les moments les plus difficiles et les plus joyeux de la vie.

Merci d'avoir fait de moi celle que je suis aujourd'hui et de m'avoir toujours encouragé pour arriver à ce jour…

Trouvez ici mon immense gratitude et ma profonde affection. Que Dieu vous garde pour moi longtemps.

A ma petite lumière Nour,

Qui m'a donné chaque jour la force et la volonté de finaliser ce travail… Que Dieu te protège ma fille.

Résumé

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et à l'Homme. Elle sévit sous forme endémique dans la plupart des régions du monde. En Algérie, toutes les données relatives à la brucellose, sont issues d'enquêtes sérologiques. Très peu d'études rapportent l'isolement, l'identification et la distribution des souches de *Brucella* existantes dans notre pays. Ce qui nous a conduit donc à mener notre étude ayant pour objectifs, d'identifier les souches de *Brucella* responsables de la brucellose bovine en Algérie ; d'établir la distribution épidémiologique de ces souches isolées, de détecter le genre *Brucella* par PCR en temps réel (PCR-TR) et de procéder à leur typage moléculaire afin de les comparer aux souches humaines déjà isolées.

Notre étude s'articule autour de deux parties : la première est la caractérisation phénotypique des souches bovines algériennes et la deuxième est la caractérisation moléculaire des souches maghrébines animales et humaines.

Dans la première partie, d'octobre 2011 à mai 2014, nous avons étudié 161 bovins séropositifs, issus de 13 wilayas, des quatre régions d'Algérie : Centre, Ouest, Est et Sud. Ces derniers ont fait l'objet de 298 prélèvements, dont 109 prélèvements de lait et 189 de ganglions lymphatiques; grâce au réseau national vétérinaire, que nous avons mis en place avec la collaboration des services vétérinaires. La caractérisation phénotypique a été réalisée selon la norme française AFNOR NF U47-105. La sensibilité aux antibiotiques des souches isolées a été testée par la méthode E-test pour 6 antibiotiques. Puis, nous avons effectué une recherche du genre *Brucella* par la méthode PCR en temps réel sur 84 prélèvements de ganglions lymphatiques prélevés sur 48 bovins séropositifs.

Nous avons pu isoler 97 souches de *Brucella* à partir de 41 ganglions rétro-mammaires, 35 laits, 18 ganglions rétro-pharyngiens et 3 inguinaux. Ces souches ont été identifiées dans 87% à *B. abortus* et dans 13% à *B. melitensis.* Parmi lesquelles 77 souches sont typées en biovars : 86% en *B. abortus* bv 3, 10% en *B. melitensis* bv 2, 3% en *B. melitensis* bv 3 et 1% en *B. abortus* bv 2. *B. abortus* bv 3 est le biovar dominant, retrouvé dans toutes les régions étudiées, alors que *B. melitensis* bv 2 est isolé principalement à l'Ouest. C'est la première fois que *B. melitensis* bv 2 et *B. abortus* bv 2 sont rapportées dans la région du Maghreb. Nous avons détecté 4 souches de *B. abortus* bv 3 résistantes à la streptomycine.

La détection des *Brucella* par la méthode PCR-TR sur 84 noeuds lymphatiques révèle un taux de positivité de 38% *vs* 34,5 % pour la bactériologie. La PCR-TR semble donc plus sensible que la bactériologie. Comme pour la bactériologie, les ganglions rétro-mammaires sont les plus fréquemment infectés par *Brucella*.

Dans la deuxième partie, nous avons comparé le génotype de la souche *B. melitensis* bv 3 bovine, à 02 souches ovines et 87 souches humaines de *B. melitensis* bv 3. Ces souches isolées durant une période de 25 ans (de 1989 à 2014), d'origines algérienne (56), marocaine (14), tunisienne (13) et au sens large maghrébines (7) quand l'origine exacte est indéterminée. Puis, nous avons comparé les génotypes des souches *B. abortus* bv 3 bovines, à une souche humaine *B. abortus* bv 3 de d'origine algérienne d'un cas importé en France. Un total de 90 souches maghrébines de *B. melitensis* bv 3, et 16 souches algériennes de *B. abortus* bv 3 ont été analysées par la méthode MLVA-16. Les résultats obtenus ont été comparés aux génotypes publiés des souches de *B. melitensis* bv 3 européennes et *B. abortus* bv 3 européennes et africaines. L'analyse moléculaire des *B. melitensis* bv 3 montre que les souches algériennes sont réparties principalement en deux clusters distincts, un cluster algéro-marocain relié à un sous-cluster européen et un cluster algéro-tunisien. Ces résultats suggèreraient l'existence de deux lignées, une résultant des échanges socio-économiques et historiques entre l'Algérie et l'Europe qui aurait pu évoluer distinctement de la deuxième lignée Maghrébine autochtone. L'analyse moléculaire des *B. abortus* bv 3 répartie les souches en deux clusters : un cluster africain et un cluster algéro-européen. Ce qui montre une proximité phylogéographique des souches algériennes et européennes, suggérant que l'origine de la brucellose bovine en Algérie pourrait être en lien avec l'importation d'animaux infectés à partir d'Europe. Notre étude constitue la première enquête moléculaire sur les souches *B. melitensis* bv 3 circulant au Maghreb et les souches *B. abortus* bv 3 circulant en Algérie.

Mots clés : Brucellose, *Brucella*, Algérie, Maghreb, bactériologie, antibiorésistance, PCR-TR, MLVA-16, bovins, humains.

Abstract

Brucellosis is an infectious, contagious disease common to many animal species and humans. It occurs endemic in most regions of the world. In Algeria, the epidemiological known and the available previous data in brucellosis were based only on serological surveys. Up today, little studies report the isolation, identification and distribution of *Brucella* strains existing in Algeria. Hence, the prevailing species and biotypes of *Brucella* in Algerian livestock are not yet known in our country. That is why, our study aims to isolate and to identify the different biotypes of *Brucella* prevailing in Algeria from infected cattle in order to establish their distribution, to detect the genus *Brucella* by real-time PCR (RT-PCR) and define their genotypes which were comparing to the human isolated strains.

Our study is based on two parts: the first concern the phenotypic characterization of Algerian bovine strains and the second concern the molecular characterization of Maghrebians animal and human strains.

In the first part, we have studied between October 2011 and May 2014, 161 naturally infected cattle coming from 13 departments, in the four regions of Algeria : Center, West, East and South. They were subjected to 298 samples, including 109 milks and 189 lymph nodes thanks to the national veterinary network, we have set up with the collaboration of veterinary services.

Brucella strain identification was performed according to the technique described by the French standard AFNOR NF U47-105. The sensitivity of the isolated strains to six antibiotics was tested by E-test method.

A total of 97 strains of *Brucella* were isolated, 41 from supramammary lymph nodes, 35 from milks and 18 from retropharyngeal and 3 from inguinal lymph nodes. This strains identified in 87% to *B. abortus* and in 13% to *B. melitensis.* Among 77 strains typed to biovars: 86% to *B. abortus* bv 3, 10% to *B. melitensis* bv 2, 3% to *B. melitensis* bv 3 and 1% to *B. abortus* bv 2. *B. abortus* bv 3 is the dominant biovar, found in all the studied regions, while *B. melitensis* bv 2 is essentially isolated in the west. It is the first time that *B. abortus* bv 2 and *B. melitensis* bv 2 were isolated from a region of the Maghreb. It is noteworthy that four of the isolated *Brucella* abortus bv 3 strains were found to be resistant to streptomycin. Then we searched the *Brucella* genus by RT-PCR on 84 samples of lymph nodes taken from 48 seropositive cattle.

The detection of *Brucella* by RT -PCR method of 84 lymph nodes reveals a positivity rate of 38% vs 34.5% for bacteriology. RT-PCR seems more sensitive than bacteriology. As for bacteriology, retro-mammary lymph nodes are most commonly infected with *Brucella*.

In the second part, we have compared the genotype of the *B. melitensis* bv 3 bovine strain to two ovine and 87 human strains of *B. melitensis* bv 3. These strains isolated over a 25 year-period (1989–2014), all have a Maghreb geographical origin: 56 strains from Algeria, 14 strains from Morocco, 13 strains from Tunisia and 7 strains from *largo sensu* Maghreb (when the country origin was not clearly determined). Then, we compared the genotypes of bovine *B. abortus* bv 3 strains, to a human strain of *B. abortus* bv 3 of an imported case in France from Algerian origin. A total of 90 *B. melitensis* bv 3 Maghreb strains and 16 *B. abortus* bv 3 Algerian strains were analyzed by MLVA-16. The obtained results were compared with genotypes of European *B. melitensis* bv 3 strains, and African and European *B. abortus* bv 3 strains. Molecular assays of *B. melitensis* bv 3 strains showed that Algerian strains were mainly distributed into two distinct clusters, one Algerian cluster related to European sub-cluster. These results led to suggest the existence of a lineage resulting from socio-historical connections between Algeria and Europe that might have evolved distinctly from the Maghreb autochthonous group. Molecular assays of *B. abortus* bv 3 strains distributed the strains on two clusters: an African cluster and an Algerian-European cluster. This shows a close phylogeographical Algerian and European strains, suggesting that the origin of bovine brucellosis in Algeria could be linked to the importation of infected animals from Europe. This study is the first molecular investigation regarding to *B. melitensis* bv 3 strains circulating in the Maghreb and *B. abortus* bv 3 strains circulating in Algeria.

Key words: Brucellosis, *Brucella*, Algeria, Maghreb, bacteriology, antibiotic resistance, RT-PCR, MLVA-16, cattle, human.

ملخص

الحمة المالطية مرض معدي مشترك بين العديد من أنواع الحيوانات و الإنسان. منتشرة في معظم أنحاء العالم، في الجزائر، كل المعطيات الوبائية المعروفة إلى يومنا هذا عن مرض الحمة المالطية، واردة عن دراسات مصلية فقط. دراسات قليلة توشي عن عزل، تصنيف و توزيع سلالات البروسيلا الموجودة في الجزائر. هذه المعطيات مازلت مجهولة في بلادنا حاليا. هذا ما أدنا إلى تشيد هذا البحث ، الذي يحمل عدة أهداف : تعيين مختلف أنواع سلالات البروسيلا المسؤولة عن البروسيلوز عند البقر في الجزائر، تجسيد توزيعهم الوبائي عبر أرجاء الوطن و تعريف النمط الجني لهذه السلالات و مقارنتها مع السلالات المعزولة قبلا عند الإنسان.
دراستنا تنقسم الى جزئين: الجزء الأول يهتم بتوصيف الظاهري للسلالات الجزائرية المعزولة عند البقر و الجزء الثاني يعني التوصيف الجزيئي للسلالات المغاربية المعزولة عند الحيوانات و الإنسان.
في الجزء الأول، درسنا من أكتوبر 2011 إلى ماي 2014، 161 ماشية مصابة بالبروسيلوز طبيعيا، أتية من 13 ولاية موزعة عبر أربع مناطق من الوطن : الوسط، الغرب، الشرق و الجنوب. خضعت هذه الأبقارالى 298 عينة، منها 109 حليب و 189 غدد ليمفاوية ، هذا بفضل الشبكة الوطنية للبياطرة التي قمنا بوضعها بمساهمة المصالح البيطرية. تم إجراء التوصيف الظاهري حسب المعيار الفرنسيAFNOR NF U47-105، ثم البحث عن حساسية السلالات المعزولة لستة مضادات حيوية بطريقة E-tset.
ثم بحثنا عن البروسلا بطريقةRT-PCR على84 عينة غدد لمفاوية أخذت من 48 بقرة مصابة
لقد إستطعنا عزل 97 سلالة بروسيلا من 41 غدد ثديية، 35 حليب، 18 غدد بلعومية و03 غدد أربية. هذه السلالات صنفت في 87% الى بروسيلا أبورتوس و في 13% الى بروسيلا ميليتانسيس. من بينهم 77 سلالة صنفت الى أنواع البيوفار:86% الى بروسيلا أبورتوس 3 ، 10% الى بروسيلا ميليتانسيس 2 ، 3% الى بروسيلا ميليتانسيس 3 و1% الى بروسيلا أبورتوس 2.
يعد بروسيلا أبورتوس 3 كالصنف السائد و الموجود في كل المناطق المدروسة. بينما بروسيلا ميليتانسيس 2 عزل أغلابيا في الغرب. إنها المرة الأولة التي يوشى فيها عن وجود بروسيلا ميليتانسيس 2 وبروسيلا أبورتوس 2 في ناحية من المغرب العربي. أكشفنا أيضا على أربع سلالات من بروسيلا أبورتوس 3 مقاومة للمضاد الحيوي ستريبتوميسين.
البحث بطريقة RT-PCR كشفت على معدل 38% ضد 34,5% بطريقة البكترولوجيا. يبدو أن طريقة حساسة أكثر من طريقة البكترولوجيا. هنا أيضا لاحظنا أن الغدد المفاوية الثديية أكثر إصابة بالبروسلا
في الجزء الثاني من دراستنا، قارنا النمط الجني لسلالة بروسيلا ميليتانسيس 3 المعزولة عند البقر الى سلالتين عزلت عند الغنم و 87 سلالة عزلت عند الإنسان من بروسيلا ميليتانسيس 3. هذه السلالات عزلت خلال 25 سنة (من 1989 الى 2014)، ذو أصل جزائري (56)، مغربي (14) ، تونسي (13) و مغاربي عندما يكون الأصل غير محدد (7).
ثم قارنا سلالات بروسلا أبورتس 3 المعزولة عند البقر و سلالة معزولة عند مريض ذو أصل جزائري
مجموع 90 سلالة مغاربية من بروسيلا ميليتانسيس 3 و16 سلالة جزائرية بروسلا أبورتس 3 حللت بالطريقة 16-MLVA. النتائج المتحصل عليها قرنت الى النمط الجني للسلالات الأروبية والإفريقية المنشورة من قبل. التحليل الجزيئي لبروسيلا ميليتانسيس 3 يبين أن السلالات الجزائرية تنفصل أساسيا الى مجموعتين، مجموعة جزائرية مرتبطة مع السلالات المغربية وجد متعلقة مع السلالات الأروبية. هذه النتائج تعي وجود سلالة تطورت عبر الوقت ناتجة عن التبادلات الإجتماعية، الإقتصادية و التاريخية بين الجزائر و أروبا، تفصل عن السلالة المغاربية المحلية ، الا و هي المجموعة الثانية المتكونة من السلالات الجزائرية و التونسية. التحليل الجزيئي لبروسيلا أبورتس 3 وهذا يدل على أن السلالات الجزائرية والأوروبية متقاربة ، مما يدل على أن أصل بروسيلا الأبقار في الجزائر يمكن أن تكون مرتبطة باستيراد الحيوانات المصابة من أوروبا. درستنا تعتبر أول تحري جزيئي حول سلالات البروسيلا السائدة في الجزائرو المغرب العربي.

كلمات مفتاح : الحمة المالطية، بروسيلا، الجزائر، المغرب العربي، التوصيف الظاهري، التوصيف الجزيئي، المقاومة للمضادات الحيوية.

SOMMAIRE

Liste des Figures
Liste des Tableaux
Liste des Abréviations

Introduction 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Etude des *Brucella* 4

1.1 Définition des *Brucella* 4
1.2 Taxonomie des *Brucella* 4
1.3 Caractéristiques bactériologiques des *Brucella* 6
1.3.1 Caractères morphologiques 6
1.3.2 Caractères culturaux 7
1.3.3 Caractères biochimiques 7
1.4 Caractéristiques génomiques des *Brucella* 9
1.5 Sensibilité aux antibiotiques 10

Chapitre 2 : Etude clinique des brucelloses

2.1 Brucellose bovine 12

2.1.1 Espèces de *Brucella* en cause 12
2.1.2 Période d'incubation 12
2.1.3 Symptômes 13
2.1.4 Evolution dans l'élevage 15

2.2 Brucellose humaine 16

2.2.1 Espèces de *Brucella* en cause 16
2.2.2Période d'incubation 16
2.2.3 Symptômes 17
2.2.4 Brucellose humaine due aux souches vaccinales 18
2.2.5 Traitement de la brucellose humaine 19

Chapitre 3 : Epidémiologie de la brucellose 16

3.1 Distribution de la brucellose bovine dans le monde 21

3.1.1 En Amérique 22
3.1.2 En Asie 23
3.1.3 En Europe 24
3.1.4 En Afrique 26
3.1.5. Au Maghreb 26
3.1.5.1 Au Maroc 26
a) Brucellose bovine 26
b) Les souches de *Brucella* identifiées au Maroc chez les bovins 28
c) Brucellose des petits ruminants 28
3.1.5.2 En Tunisie 29
a) Brucellose bovine 29
b) Les souches de *Brucella* identifiées en Tunisie chez les bovins 30
c) Brucellose des petits ruminants 30
3.1.5.3 En Algérie 32
a) Brucellose bovine 32
b) Les souches de *Brucella* identifiées en Algérie chez les bovins 35
c) Brucellose des petits ruminants 35
i) Brucellose caprine 35
ii) Brucellose ovine 39
iii) Les souches de *Brucella* identifiées en Algérie chez les petits ruminants 40
40

3.2 Distribution de la brucellose humaine dans le monde 41

3.2.1 En Amérique 45
3.2.2 En Australie 45
3.2.3 En Asie 45
3.2.4 En Europe 46
3.2.5 En Afrique 48
3.2.6 Au Maghreb 48
3.2.6.1 Au Maroc 48
3.2.6.2 En Tunisie 48
3.2.6.3 En Algérie 51
a) Caractéristique de la brucellose humaine en Algérie 54
b) Les souches de *Brucella* identifiées chez l'Homme en Algérie 57

Chapitre 4 : Typage des *Brucella* 58

4.1 Typage phénotypique des *Brucella* 58

4.1.1 Mesures de sécurité 58
4.1.2 Prélèvements 58
4.1.2.1 Sur l'animal vivant 58
4.1.2.2 Sur l'animal mort 59
4.1.3 Isolement des *Brucella* 59

4.1.3.1 Mise en culture des prélèvements 59
4.1.3.2 Milieux de culture 60
4.1.3.3 Incubation et lecture 61
4.1.4 Identification du genre *Brucella* 62
4.1.4.1 Caractères macroscopiques 62
4.1.4.2 Caractères microscopiques 63
4.1.4.3 Test de l'uréase 64
4.1.4.4 Test de l'oxydase 64
4.1.5 Typage de l'espèce et du biovar des *Brucella* 64
4.1.5.1 Besoin en CO_2 65
4.1.5.2 Agglutination par les sérums monospécifiques 65
4.1.5.3 Lyse par les bactériophages ou lysotypie 65
4.1.5.4 Sensibilité aux colorants 67
4.1.5.5 Production d'H_2S 67

4.2 Typage moléculaire des *Brucella* 68

4.2.1 Polymorphisme des *Brucella* et les gènes utilisés pour les méthodes moléculaires 68
4.2.1.1 Gène *bcsp31* 68
4.2.1.2 Séquence d'insertion IS*711* ou IS*6501* 69
4.2.1.3 Protéines membranaires (*omp*) 69
4.2.1.4 Protéine périplasmique BP26 70
4.2.1.5 Gène pérosamine synthétase (*per*) 70
4.2.2 Extraction de l'ADN des *Brucella* 70
4.2.3 Les PCR en Temps réel 71
4.2.4 Les PCR multiplex 73
4.2.4.1 AMOS PCR 74
4.2.4.2.Bruce-ladder 74
4.2.4.3.Bruce-ladder suis ou suis-ladder 76
4.2.4.4 RAPD PCR 76
4.2.5 RFLP 76
4.2.6 Les VNTR et MLVA 77
4.2.6.1 HOOF-Print 77
4.2.6.2 VNTR-21 77
4.2.6.3 MLVA- 15 78
4.2.6.4 MLVA -16 79
4.2.6.5 MLST ou MLSA 80
4.2.6.6 SNP 82

ETUDE EXPERIMENTALE

Problématique et objectifs de l'étude 83

PARTIE I : Caractérisation phénotypique des *Brucella* bovines, détection par PCR en temps réel et évaluation de leurs sensibilités aux antibiotiques 85

I. MATERIELS ET METHODES

A. Méthodologie de l'étude 85

B. Caractérisation phénotypique des brucelles 85

1. Isolement des *Brucella* 95

2. Identification du genre *Brucella* 95

3. Biotypage des *Brucella* 103

4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques 107

5. Mise en souchothèque 111

C. Détection du genre *Brucella* par PCR en temps réel (PCR-TR) 115

1. Extraction de l'ADN à partir des prélèvements des ganglions lymphatiques 116

2. Technique de la PCR en temps réel 116

117

II. PLAN D'ANALYSE

A. Description de la population d'étude 119

B. Nombre de prélèvements réalisés 119

124

III. RESULTATS & DISCUSSIONS

A. Résultats du typage phénotypique 132

B. Sensibilité aux antibiotiques 132

C. Détection du genre brucella par PCR en Temps Réel 180

1. Résultats des PCR-TR 183

2. Comparaison des approches moléculaires (PCR-TR) et bactériologiques pour la détection du genre Brucella dans les prélèvements bovins 183

3. Distribution des *Brucella* dans les prélèvements bovins 184

186

IV. DISCUSSION GENERALE DE LA PARTIE I

187

V. CONCLUSION DE LA PARTIE I

194

PARTIE II : Caractérisation moléculaire des *Brucella* par Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA) 195

I. Matériels et méthodes 195

1. Matériel biologique 195

2. Extraction des ADN 202

3. MLVA-16 205
4. Electrophorèse 206
5. Lecture et interprétation 206
6. Identification des génotypes de *Brucella* 206
7. Calcul de l'index de diversité 207
8. Elaboration des dendrogrammes 208
II. Caractérisation moléculaire des souches de *B. melitensis* bv 3 208
A. RESULTATS 208
1. Robustesse de la méthodologie MLVA-16 appliquée à notre étude 212
2. Analyse des possibles relations phylogéographiques 220
B. DISCUSSION 224
III. Caractérisation moléculaire des souches *B. abortus* bv 3 224
A. Résultats & Discussion

Conclusion générale 232
Recommandations et Perspectives 233
Références bibliographiques
Article
Communications orales et affichées

Annexes

Annexe 1 : Fiche de renseignements
Annexe 2 : Protocole de prélèvements
Annexe 3 : Textes réglementaires Brucellose bovine
Annexe 4 : Textes réglementaires Brucellose ovine et caprine
Annexe 5 : Composition Milieu de Farrell
Annexe 6 : Table d'assignement des allèles
Annexe 7 : Liste des prélèvements testés en PCR-TR

LISTE DES FIGURES

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Etude des *Brucella*

Figure 1.1 :	*Brucella* spp. coloration de Gram	6
Figure 1.2 :	*Brucella melitensis*	6
Figure 1.3 :	*Brucella abortus*	6
Figure 1.4 :	Colonies de *B. abortus* sur gélose chocolat	7
Figure 1.5 :	Colonies de *Brucella* sur Milieu Farrell	7

Chapitre 2 : Etude clinique des brucelloses

Figure 2.1 :	avorton de buffle due à une infection à *Brucella abortus* biovar 1	14
Figure 2.2 :	Nécrose du testicule (droit) chez un taureau atteint d'une orchite unilatérale due à *Brucella abortus*	14
Figure 2.3 :	Hygroma au niveau de l'articulation du carpe gauche d'un buffle africain	15

Chapitre 3 : Epidémiologie de la brucellose

Figure 3.1 :	Distribution de la brucellose bovine dans le monde en 2005	21
Figure 3.2 :	Evolution du nombre de foyers de brucellose bovine et de petits ruminants en Tunisie de 2004 à 2009	30
Figure 3.3 :	Evolution du nombre de foyers de brucellose ovine et caprine de 1989 à 2009	31
Figure 3.4 :	Evolution du taux d'infection national de la brucellose bovine en Algérie de 1995 à 2013	34
Figure 3.5 :	Répartition des foyers de brucellose bovine et caprine en Algérie (année 2010)	35

Figure 3.6 :	Evolution du taux d'infection national de la brucellose caprine en Algérie de 1995 à 2013	37
Figure 3.7 :	Répartition géographique de la prévalence cheptel de la brucellose des petits ruminants	38
Figure 3.8 :	Prévalence de la brucellose par type de cheptel et par région	38
Figure 3.9 :	Evolution du nombre de caprins et ovins vaccinés de 2006 à 2013	38
Figure 3.10:	Distribution des wilayas concernées par la vaccination en Algérie en 2011	39
Figure 3.11:	Nombre de foyers ovins déclarés de 1998 à 2010	40
Figure 3.12:	Distribution de la brucellose humaine dans le monde	41
Figure 3.13:	Evolution du taux d'incidence de la brucellose humaine en Tunisie entre 1995 et 2011	50
Figures 3.14:	Distribution géographique de la brucellose humaine de 1989 à 2006 selon la répartition des cheptels	51
Figure 3.15:	Répartition des zoonoses en Algérie en 2010	53
Figures 3.16:	Evolution de l'incidence annuelle de la brucellose humaine en Algérie de 1990 à 2011	53
Figure 3.17:	Répartition de la brucellose humaine en Algérie pour l'année 2011	54
Figure 3.18:	Répartition des cas de brucellose en fonction du sexe pour l'année 2011	55
Figure 3.19:	Répartition des cas de brucellose humaine selon l'âge	55
Figure 3.20:	Répartition des cas de brucellose en fonction du mode de contamination années 1988 à 1991	56
Figure 3.21:	Incidence mensuelle de la brucellose humaine en Algérie pour l'année 2011	57
Figure 3.22:	Evolution mensuelle du nombre de cas humains par rapport aux cas caprins et bovins (2001)	57

Chapitre 4: Typage des *Brucella*

Figure 4.1 :	Evolution de la croissance de *B. melitensis*	62
Figure 4.2 :	Les colonies de *Brucella* à la lumière réfléchie oblique	63

Figure 4.3 : Colonies de *Brucella* colorées au cristal violet 63

Figure 4.4 : *Brucella spp.* Coloration de Gram 64

Figure 4.5 : *Brucella spp.* coloration de stamp 64

Figure 4.6 : Agglutination de sérums monospécifiques 65

Figure 4.7 : Différenciation de toutes les espèces de *Brucella* et des souches vaccinales par la Bruce-ladder multiplex PCR. 75

Figure 4.8 : Identification et différentiation de toutes les espèces et biotypes de *Brucella* connues par PCR multiplex modifiée 75

Figure 4.9 : Analyse de parcimonie maximale, sur 21 souches de référence utilisant les données des 71 marqueurs. 78

Figure 4.10 : Minimum spanning tree basé sur multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA15Orsay) données à partir de 1925 isolats 80

Figure 4.11 : Reconstruction phylogénétique sans racines des relations entre STs 81

ETUDE EXPERIMENTALE

PARTIE I

Caractérisation phénotypique des *Brucella* bovines, détection par PCR en temps réel et évaluation de leurs sensibilités aux antibiotiques

Figure 5.1: Les wilayas étudiées selon les régions 85

Figure 5.2 : Création du réseau national vétérinaire pour la récolte de prélèvements selon l'organisation des services vétérinaires. 86

Figures 5.1 : Technique d'isolement des *Brucella* à partir du lait 96

Figure 5.2 : Technique d'isolement des *Brucella* à partir des ganglions lymphatiques 100

Figure 5.3 : Incubation des boites en atmosphère renfermant 5 à 10 % de CO_2 dans une étuve à 35°C 101

Figures 5.4: Colonies de *Brucella* 103

Figures 5.5 : Coloration de Gram de *Brucella* (x 100) 104

Figure 5.6:	Colonies lisses "S" de *Brucella* colorées par l'épreuve de cristal violet.	104
Figure 5.7:	Test oxydase positif sur un disque oxydase	105
Figure 5.8:	Test uréase sur milieu de Christensen	106
Figure 5.9:	Test des sérums monospécifiques.	107
Figure 5.10:	Test de la production d'H_2S	108
Figures 5.11:	Test de sensibilité aux colorants	109
Figures 5.12:	Test de lysotypie	110
Figures 5.13:	Préparation de l'inoculum	112
Figure 5.14:	Technique de l'E-test	113
Figure 5.15:	E-test de *Brucella* sp.	114
Figure 5.16:	Préparation de la souchothèque	116
Figure 5.17:	Distribution du nombre de bovins étudiés par wilaya	122
Figure 5.18:	Répartition des animaux étudiés selon la tranche d'âge.	123
Figure 5.19:	Répartition des animaux étudiés selon la race	124
Figure 5.20:	Distribution du nombre de prélèvements par wilaya selon les types de prélèvements réalisés	127
Figure 5.21:	Proportion de chaque type de prélèvements.	128
Figure 5.22:	Répartition des animaux positifs selon la race	140
Figure 5.23:	Répartition des animaux positifs selon l'origine de la race	141
Figure 5.24:	Nombre de prélèvements positifs par wilaya	148
Figure 5.25:	Nombre de souches *Brucella* isolées par type de prélèvements	160
Figure 5.26:	Proportion des espèces de *Brucella* isolées	161
Figure 5.27:	Proportion des biovars de *Brucella* isolés	163
Figure 5.28:	Répartition des souches de *B. abortus* par région	165
Figure 5.29:	Répartition des souches de *B. melitensis* par région	165
Figure 5.30:	Proportion de chaque espèce de *Brucella* isolée selon les régions	166

étudiées

Figure 5.31: Proportion des Biovars *Brucella* identifiés selon les régions 167

Figure 5.32: Proportion de chaque espèce de *Brucella* isolée dans chacune des wilayas étudiée 171

Figure 5.33: Distribution des souches *B. abortus* isolées dans les wilayas étudiées 172

Figure 5.34: Distribution des souches *B. melitensis* isolées dans les wilayas étudiées. 173

Figure 5.35 : Distribution des différents biovars *Brucella* identifiés dans les wilayas étudiées 174

PARTIE II
Caractérisation moléculaire des *Brucella* par Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA)

Figure 6.1: Les étapes de la méthode MLVA 206

Figure 6.2: Amplification des loci du panel 2B ; (A) Bruce 04; (B) Bruce 07 208

Figure 6.3: Amplification des loci du panel 2B ; (C) Bruce 09 ; (D) Bruce 16 209

Figure 6.4: MST des génotypes MLVA-11 des isolats *B. melitensis* bv 3 dans le monde 213

Figure 6.5: MST des génotypes MLVA-16 des isolats Maghrébins. 215

Figure 6.6: Dendrogramme des génotypes MLVA-16 des souches Françaises et Maghrébines 217

Figure 6.7 : MST des génotypes MLVA-16 des souches *B. melitensis* 3 dans le monde 218

Figure 6.8: MST des génotypes MLVA11 de 203 souches de B. abortus bv 3 Algérie, Europe* et Afrique** (excepté Algérie) 226

Figure 6.9 : Dendrogramme des génotypes MLVA16 de 205 souches *B. abortus* bv 3 (UPGMA, categorie) 228

Figure 6.10: MST des génotypes MLVA16 des 205 souches *B. abortus* (avec pondération des panels) 230

LISTE DES TABLEAUX

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Etude des *Brucella*

Tableau 1.1 : Les différentes espèces et biovars du genre *Brucella*, leurs caractéristiques épidémiologiques et leur pouvoir pathogène chez l'homme 8

Tableau 1.2 : Antibiotiques actifs *in vitro* et efficacités *in vivo* sur *Brucella spp.* 11

Chapitre 2 : Etude clinique des brucelloses

Tableau 2.1 : Dose infectante des espèces de *Brucella* 16

Tableau 2.2 : Signes généraux et symptômes de la brucellose 18

Tableau 2.3 : Brucellose focalisée 18

Chapitre 3 : Epidémiologie de la brucellose

Tableau 3.1 : Infections à *Brucella* recensées en Europe depuis 1994 25

Tableau 3.2 : Incidence mondiale de la brucellose humaine 42

Chapitre 4 : Typage des *Brucella*

Tableau 4.1: Caractéristiques différentiels des espèces de *Brucella* 66

Tableau 4.2 : Caractéristiques différentiels des biovars de *Brucella* 67

ETUDE EXPERIMENTALE
PARTIE I :
Caractérisation phénotypique des *Brucella* bovines, détection par PCR-TR et évaluation de leurs sensibilités aux antibiotiques

Tableau 5.1 :	Nombre d'animaux et d'élevages étudiés par wilaya.	120
Tableau 5.2 :	Nombre d'animaux prélevés par région.	120
Tableau 5.3 :	Nombre de prélèvements par région et par wilaya.	125
Tableau 5.4 :	Nombre de prélèvements réalisés par région	125
Tableau 5.5 :	Nombre de prélèvements par wilayas et par type de prélèvements	126
Tableau 5.6 :	Nombre de prélèvements réalisés par animal.	129
Tableau 5.7 :	Nombre de prélèvements réalisés par animal dans chaque wilaya étudiée.	130
Tableau 5.8 :	Nombre de prélèvements par animal dans chaque région étudiée.	131
Tableau 5.9 :	Nombre d'élevages positifs par wilaya.	133
Tableau 5.10 :	Nombre d'élevages positifs par région	134
Tableau 5.11 :	Nombre d'animaux positifs par rapport aux foyers par région et par wilaya	135
Tableau 5.12:	Nombre d'animaux positifs par wilaya.	136
Tableau 5.13:	Nombre d'animaux positifs par région	137
Tableau 5.14:	Nombre d'animaux positifs par tranche d'âge	138
Tableau 5.15:	Nombre d'animaux positifs par race	139
Tableau 5.16:	Nombre d'animaux positifs selon l'origine de la race	140
Tableau 5.17:	Nombre d'animaux positifs présentant des signes cliniques	142
Tableau 5.18:	Nombre d'animaux positifs présentant des avortements	142
Tableau 5.19:	Nombre d'animaux positifs présentant une rétention placentaire	143
Tableau 5.20:	Nombre d'animaux positifs présentant une arthrite	144
Tableau 5.21:	Nombre de prélèvements positifs sur les animaux positifs dans chaque région et wilaya.	145

Tableau 5.22 : Nombre de prélèvements positifs par wilaya. 146
Tableau 5.23 : Nombre de prélèvements positifs par région 147
Tableau 5.24 : Nombre de prélèvements positifs selon les types de prélèvements 149
Tableau 5.25 : Nombre de prélèvements de lait positifs par wilaya 150
Tableau 5.26 : Nombre de prélèvements de lait positifs par région. 151
Tableau 5.27 : Nombre de prélèvements de ganglions positifs par wilaya. 152
Tableau 5.28 : Nombre de prélèvements de ganglions positifs par région 152
Tableau 5.29: Nombre de ganglions rétro-pharyngiens positifs par wilaya 153
Tableau 5.30 : Nombre de ganglions rétro-pharyngiens positifs par région 154
Tableau 5.31 : Nombre de ganglions rétro-mammaires positifs par wilaya. 155
Tableau 5.32: Nombre de ganglions rétro-mammaires positifs par région 155
Tableau 5.33 : Type de prélèvements positifs en fonction de l'âge de l'animal 156
Tableau 5.34 : Nombre de souches *Brucella* isolées par région et par wilaya 157
Tableau 5.35 : Nombre de souches *Brucella* isolées par animal. 158
Tableau 5.36: Nombre de souches *Brucella* isolées par race 158
Tableau 5.37: Nombre de souches *Brucella* isolées par tranche d'âge. 159
Tableau 5.38: Nombre de souches *Brucella* isolées par signe clinique 160
Tableau 5.39 : Les espèces de *Brucella* identifiés dans chaque région 165
Tableau 5.40 : Les biovars identifiés pour chaque région 168
Tableau 5.41 : Les espèces et biovars *Brucella* identifiés par wilaya 169
Tableau 5.42 : Nombre d'espèces identifiées par type de prélèvements 175
Tableau 5.43 : Nombre de biovars identifiés par type de prélèvements 175
Tableau 5.44: Nombre d'espèces *Brucella* identifiées par race 176
Tableau 5.45: Nombre de biovars *Brucella* identifiés par race 177
Tableau 5.46 : Nombre d'espèces typées par tranche d'âge 178

Tableau 5.47 : Nombre de biovars typés par tranche d'âge. 178

Tableau 5.48 : Nombre d'espèces typées selon les signes cliniques 179

Tableau 5.49 : Nombre de biovars typés selon les signes cliniques 179

Tableau 5.50 : Sensibilité des souches de *Brucella* identifiées aux 6 antibiotiques testés 181

Tableau 5.51 : Analyse des prélèvements par PCR-TR 183

Tableau 5.52 : Résultats des PCR-TR au niveau des animaux 184

Tableau 5.53 : Résultats en PCR-TR *vs* Bactériologie à partir des prélèvements 184

Tableau 5.54 : Nombre d'animaux positifs en PCR-TR *vs* Bactériologie 185

Tableau 5.55 : Comparaison des résultats PCR –TR *vs* Bactériologie 185

Tableau 5.56 : Résultats bactériologiques et moléculaires selon les types de prélèvements 186

PARTIE II :

Caractérisation moléculaire des *Brucella melitensis* bv 3 par Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA)

Tableau 6.1: Souches *Brucella melitensis* biovar 3 isolées à partir de différentes origines géographiques, étudiées dans cette étude et résultats des génotypes MLVA 197

Tableau 6.2: Les souches de *Brucella abortus* biovar 3 étudiées 201

Tableau 6.3: Oligonucléotides utilisés dans cette étude 203

Tableau 6.4: Valeurs HGDI pour *B. melitensis* bv 3 de chaque marqueur génétique MLVA-16 210

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	acides désoxyribonucléiques.
AMOS PCR :	*abortus melitensis ovis suis* PCR
ANSES:	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN :	acides ribonucléiques.
ASS :	Afrique subsaharienne
B. abortus :	*Brucella abortus*
B. melitensis :	*Brucella melitensis*
B. suis :	*Brucella suis*
***B. abortus* bv 3:**	*Brucella abortus* biovar 3
***B. melitensis* bv 3:**	*Brucella melitensis* biovar 3
BAB 2 :	Blood Agar Base N°2
B B A :	Bordj Bou Arreridj
bcsp31 :	Brucella cell surface protein 31
***bp* :**	protéine périplasmique
BTS :	Bouillon Trypticase Soja
***Brucella* sp. :**	espèce, du latin *species pluralis*
***Brucella* spp. :**	espèce, du latin *species pluralis*
BS :	Blood Agar Base N°2 + Sérum
cas/ 100 000 hab :	cas par 100 000 habitants
CMI :	concentration minimale inhibitrice
D.O. :	densité optique
DSV :	Direction des Services Vétérinaires

E-test :	Epsilometer test
EAT :	Epreuve à l'Antigène Tamponné
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FC :	Epreuve de la Fixation du complément
***g* :**	intensité de la pesanteur artificielle
h :	heure
HOOF-Print *:*	Hypervariable Octameric Oligonucleotide Fingerprints
IC :	Intervalle de confiance
INSP :	Institut National de Santé Publique
IPA :	Institut Pasteur d'Algérie
IPT :	Institut Pasteur de Tunis
IS*711* ou IS*6501 :*	insertion sequence
Iz:	Izatnagar
Kg :	kilogramme
mg :	milligramme
min :	minute
mL :	millilitre
MLSA :	MultiLocus Sequence Analysis
MLST *:*	MultiLocus Sequence Typing
MLVA :	Multiple Loci VNTR Analysis
NSB 3 :	Niveau 3 de Sécurité Biologique
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCR :	polymerase chain reaction
PCR -TR :	PCR en temps réel
***per* :**	pérosamine synthétase

per os :	par voie orale
PFE :	projet de fin d'études
PSM :	Post de Sécurité Microbiologique.
OBF :	officially brucellosis free
OIE :	Office Internationale des Epizooties ou Organisation Mondiale de Santé Animale
ONSSA :	Office Nationale de la sécurité sanitaire des produits alimentaires
omp :	Outer Membrane Proteins
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
p :	probabilité
PFE :	Projet de Fin d'Etudes
RAPD PCR :	Random Amplified Polymorphic DNA PCR
REM :	Relevé épidémiologique mensuel
RFLP :	Restriction Fraction Length Polymorphisme
SDA :	serum-dextrose agar
SNP :	single nucleotide polymorphism
STP :	Solution saline Tamponnée au Phosphate
Tb :	Tbilissi
UE :	Union Européenne
UFC :	Unités Formant Colonies
VNTR :	Variable Number of Tandem Repeats
Wb :	Weybridge
X^2 :	Khi 2

INTRODUCTION

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales (terrestres et marines) et à l'Homme, due à des bactéries du genre *Brucella*. C'est une maladie de répartition et d'importance mondiales. Elle est reconnue par la FAO, l'OMS et l'OIE comme une des zoonoses les plus répandues au monde (F.A.O., O.M.S., O.I.E.).

La brucellose animale est endémique dans la plupart des régions du monde, bien que les incidences et les prévalences rapportées varient considérablement d'un pays à un autre, et dans différentes régions d'un même pays (Acha and Szyfres, 2005). La brucellose humaine est très fréquente, son incidence est estimée par l'OMS au niveau mondial à 500 000 nouveaux cas annuels (Corbel, 1997 ; Pappas, 2006).

La brucellose occasionne de lourdes pertes économiques, au secteur des productions animales difficiles à chiffrer en raison des différents facteurs qui interviennent dans son estimation, avec des pertes directes et indirectes (F.A.O., O.M.S., O.I.E.).

En Algérie, la brucellose animale a été mise en évidence pour la première fois, au début du 19ème siècle, par les travaux de Sergent et *al.* (1908), qui ont isolé *Micrococcus melitensis* chez les animaux domestiques. L'origine de la maladie fût attribuée à l'importation des chèvres et vaches maltaises et des chèvres espagnoles (Wyatt, 2009, 2013). Depuis, plusieurs études menées dans les différentes régions d'Algérie, sur les différentes espèces animales domestiques (bovins, ovins, caprins, camelins et canins), rapportent des prévalences variables d'une région à l'autre et d'une espèce animale à l'autre.

Les autorités vétérinaires ont mis en place un programme national de lutte contre cette maladie, depuis 1995, basé sur une prophylaxie sanitaire (dépistage/abattage). Deux décennies plus tard, les services vétérinaires déclarent un taux d'infection de 1% chez les bovins dépistés, qui ne représentent que 6% de la population bovine (Lounes et *al.*, 2009) (effectif bovin de 1 909 455 de têtes, en 2013 (DSV)).

En dépit de ces 20 ans de lutte, ce taux n'a pas connu de réelle amélioration. Pour les petits ruminants, une prophylaxie médicale a été instaurée en 2006, basée sur la vaccination par le Rev 1. Durant les deux dernières décennies, une prévalence moyenne de 5,38% est déclarée chez les caprins dépistés, qui ne représente que 1% de la population caprine (Lounes et *al.*, 2009) (effectif caprin de 4 910 700 de têtes, en 2013 (DSV)). On considère que le caprin est la source principale de la contamination humaine, en Algérie (DSV, 2005).

Elle provoque des pertes économiques importantes, à titre d'exemple durant la décennie 2004 à 2013, le montant des indemnités pour les 8396 bovins et 15464 caprins abattus, était de plus de 556 millions de dinars algériens (DSV).

L'Algérie occupe la 10ème place au monde concernant le nombre de cas de brucellose humaine déclarés annuellement (Pappas et *al.*, 2006). Dans notre pays, la brucellose occupe la deuxième place par rapport aux zoonoses à déclaration obligatoire. Les données les plus récentes de l'Institut National de la Santé Publique (INSP) rapportent 10014 cas humains déclarés pour la seule année 2010, soit un taux de 28 cas/100000 hab. (Relevé Epidémiologique Mensuel (REM), 2010).

Toutes ces données épidémiologiques sont basées sur des enquêtes et des dépistages sérologiques. Les épreuves sérologiques analysent la mémoire immunologique de l'animal. L'information que l'analyse sérologique nous donne dépend du pathogène, du site infecté, de l'hôte et du stade de la maladie. Toutefois, elles manquent foncièrement de spécificité et de sensibilité (réactions croisées avec d'autres agents infectieux, erreurs d'interprétations). Se fonder sur des preuves sérologiques seules peut être potentiellement trompeur. Le seul diagnostic de certitude reste la bactériologie. L'isolement des souches de *Brucella* existantes dans les élevages algériens est donc très important. Sur le plan épidémiologique, la connaissance des espèces et biovars de *Brucella* existants et dominants dans les élevages algériens, peut fournir de précieuses informations permettant de « tracer » les infections, notamment dans les pays où plusieurs biovars sont rencontrés. C'est aussi une donnée cruciale et une étape nécessaire, à la mise en place des politiques et stratégies de contrôle et de lutte contre la brucellose dans la population animale.

Le « gold standard » pour le diagnostic de la brucellose est donc l'isolement des *Brucella*. Cependant, pour isoler les *Brucella*, il faut du temps et d'importantes ressources, ceci requiert un laboratoire niveau 3 et un personnel technique qualifié pour manipuler les échantillons et les bactéries vivantes pour une éventuelle identification et typage. Toute manipulation directe des *Brucella* comporte des risques d'infection en laboratoire, et des règles très strictes de biosécurité doivent être respectées.
Afin d'éviter ces inconvénients et ces difficultés, les méthodes de biologie moléculaire deviennent très utiles et des progrès considérables ont été accomplis récemment pour améliorer leur sensibilité, spécificité, leur facilité technique et de réduire leurs coûts. Ces méthodes sont utilisées avec succès pour le typage des *Brucella*, et deviennent des outils très importants d'identification des *Brucella* au niveau espèce et récemment aussi au niveau biovar. Ces techniques nécessitent un confinement biologique minimum et peuvent fournir des résultats dans un temps très court. En outre, l'empreinte génétique des isolats aide dans les études épidémiologiques de la maladie et de son contrôle (Yu and Nielsen, 2010).

Dans notre pays, les *Brucella* sont rarement recherchées dans les laboratoires de bactériologie. Les autres laboratoires, y compris ceux relevant de l'agriculture ne font malheureusement pas de la recherche des *Brucella* une priorité. Actuellement, le laboratoire de Bactériologie Médicale de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) est le seul à effectuer cette recherche et uniquement sur des prélèvements humains. Les méthodes moléculaires ne sont pas encore mises en place pour le typage de cette bactérie.

A cet égard, la littérature est particulièrement limitée. Deux études uniquement sont retrouvées. A l'Ouest du pays, Boudilmi et *al.* (1990) ont isolé *B. melitensis* biovar 3 chez des caprins, ovins ainsi que chez l'Homme. L'autre étude a rapporté l'identification du même biovar dans des prélèvements bovins et humains à Tiaret (Aggad et *al.,* 2006). Durant les deux dernières décennies, les souches humaines diagnostiquées à l'Institut Pasteur d'Algérie sont identifiées à *B. melitensis* bv 3 (Korichi et *al.,* 2005). Ces données limitées portent à penser que le biovar existant en Algérie est *B. melitensis* bv 3. Cependant, il est à noter qu'en France, si les souches humaines d'origine algérienne sont majoritairement de cette espèce, deux souches ont été identifiées comme appartenant aux biovars 1 et 3 de *B. abortus* (Cloeckaert et *al.,* 2003 ; Garin-Bastuji, 2004). Ceci montre qu'on ne connait pas les différentes espèces et biovars de *Brucella* qui circulent dans nos élevages. La question reste donc posée quant aux différentes souches existantes chez les principales espèces animales domestiques, leur traçabilité et leur distribution dans toutes les régions d'Algérie. Ceci nous a conduit à mener notre étude ayant pour objectifs : d'isoler et d'identifier les souches de *Brucella* responsables de la brucellose bovine en Algérie, par une caractérisation phénotypique par la méthode bactériologique classique; de détecter les *Brucella* par une PCR en temps réel, de tester leur sensibilité aux antibiotiques utilisés pour le traitement de la brucellose humaine ; d'établir leur distribution épidémiologique à travers les quatre régions d'Algérie et de procéder à leur typage moléculaire afin de les comparer aux souches humaines déjà isolées, par la méthode moléculaire MLVA-16.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1
ETUDE DES *BRUCELLA*

CHAPITRE 1
ETUDE DES *BRUCELLA*

1.1 Définition des *Brucella*

Les *Brucella* sont des coccobacilles à Gram négatif, immobiles, non sporulés, dépourvus de capsule, ne fermentant pas le lactose sur gélose de Mac Conkey, ne produisant pas d'acide sur gélose glucosée, réduisant les nitrates en nitrites, n'utilisant pas le citrate, ne produisant pas d'indole, négatifs dans la réaction de Voges-Proskauer et ne provoquant aucune hémolyse sur gélose au sang. Les *Brucella* présentent une réaction à la catalase positive et, le plus souvent, des réactions d'oxydase et d'uréase positives. Enfin, les *Brucella* agglutinent généralement les sérums hyper-immuns ou anticorps monoclonaux spécifiques (Norme AFNOR NF U 47-105).

1.2 Taxonomie des *Brucella*

Selon le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology et le sous comité de la taxonomie des *Brucella*, la classification des *Brucella* se fait comme suit (Garrity et al., 2004; Osterman and Moriyón, 2006):

Classe I : Alphaproteobacteria

Ordre VI : Rhizobiaceae

Famille III : Brucellaceae

Genre I : Brucella

Espèces :		**Biovars :**
Brucella melitensis	(Hughes 1893) Meyer et Shaw 1920	1, 2, 3
Brucella abortus	(Schmidt 1901) Meyer et Shaw 1920	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9
Brucella suis	Huddleson 1929	1, 2, 3, 4, 5
Brucella ovis	Buddle 1956	
Brucella canis	Stoenner et Lackman 1957	
Brucella neotomea	Carmichael et Bruner 1968	
Brucella ceti	Cloeckaert *et al.,* 2001; Foster *et al.,* 2007	
Brucella pinnipedialis	Cloeckaert *et al.,* 2001; Foster *et al.,* 2007	
Brucella microti	(Hubalek *et al.,* 2007) Scholz *et al.,* 2008	
Brucella inopinata	(De *et al.,* 2008) Scholz *et al.,* 2010	
BO2	Tiller *et al.,* 2010	
Brucella papionis	Whatmore et al., 2014	

L'histoire du genre *Brucella* a commencé avec la reconnaissance par Evans (1918) de la similarité de l'agent de la fièvre de Malte rapporté par Bruce (1887) et plus tard décrit comme « *Micrococcus melitensis* », au *Bacterium abortus*, l'agent des avortements contagieux des bovins décrit par Bang (1897) et la bactérie isolée des avortements chez les truies par Traum (1914). Sur cette base, Meyer et Shaw (1920) ont définit le genre *Brucella*, comprenant les espèces *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*. Plus tard l'organisme isolé des porcins a été identifié comme étant la troisième espèce, *Brucella suis*. Puis d'autres espèces ont été ajoutées: *B. ovis* décrit en 1956, suivie de *B. neotomae* et *B. canis*. Il faut noter que les critères utilisés pour la classification du genre sont basés sur les caractéristiques phénotypiques et relativement selon l'hôte préférentiel naturel (Banai and Corbel, 2010).

Ainsi le genre *Brucella* a été anciennement divisé en six espèces, elles-mêmes séparées en biovars, en fonction notamment d'une relative spécificité de l'hôte animale infecté par chaque espèce.

Verger et al. (1985) ont remis en question la taxonomie du genre *Brucella*, suivant l'étude de l'hybridation ADN, puis les études sur la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomial 16S, qui ont montré que l'ADN de *Brucella* était fortement homogène assimilable à une seule et même espèce. Ainsi le genre *Brucella* était en fait monospécifique. Les espèces décrites appartiennent à une seule espèce unique , dont le nom proposé est *Brucella melitensis*, les anciennes espèces sont ramenées au rang de sous espèces ou nomenspecies (Banai and Corbel, 2010). Mais cette nouvelle classification n'a pas été adoptée par le sous comité de la taxonomie des *Brucella*, car la classification habituelle garde toute sa valeur sur le plan clinique et épidémiologique (Osterman and Moriyón, 2006).

En accord avec l'ancienne classification, des noms d'espèces ont été proposés pour les souches isolées des mammifères marins : *Brucella ceti* (isolées de dauphins) et *Brucella pinnipedialis* (isolées de pinnipèdes, notamment phoques, otaries et morses)(Foster et al., 2007).

Récemment de nouvelles espèces ont été découvertes : *B. microti* isolée à partir prélèvements de campagnols (*Microtus arvalis*) au cours d'une épizootie en République tchèque en 2001 (Scholz et al., 2008). Deux nouvelles souches ont été chacune isolées à d'un seul cas humain ; *B. inopinata* isolée d'une infection des implants mammaires d'une patiente de 71 ans présentant des signes cliniques de la brucellose (Scholz et al., 2010) ; et BO2 isolée à partir d'une biopsie pulmonaire d'un patient atteint d'une maladie pulmonaire chronique, l'analyse de l'isolat a montré une forte similitude avec *B. inopinata* (Tiller et al., 2010). Enfin, *B. papionis* isolée d'échantillons cliniques obtenus à partir d'un babouin (*Papio spp.)* qui avait mis bas d'un mort-nés (Whatmore et al., 2014).

1.3 Caractéristiques bactériologiques des *Brucella*

1.3.1 Caractères morphologiques

Les *Brucella* sont parmi les plus petites bactéries, mesurant 0,6 - 1,5 µm de long et 0,5-0,7 µm de diamètre. Parfois en petits coccobacilles de 0,5 µm, parfois légèrement allongées en bacilles de 1 à 1,5 µm de longueur. Bactéries à Gram négatif, immobiles, elles ne sont pas décolorées par l'acide acétique (coloration de Stamp), ce qui indique une acido-résistance liée aux lipides de la paroi (Lavigne et al, 2011; Maurin, 2007 ; Roux, 1984).

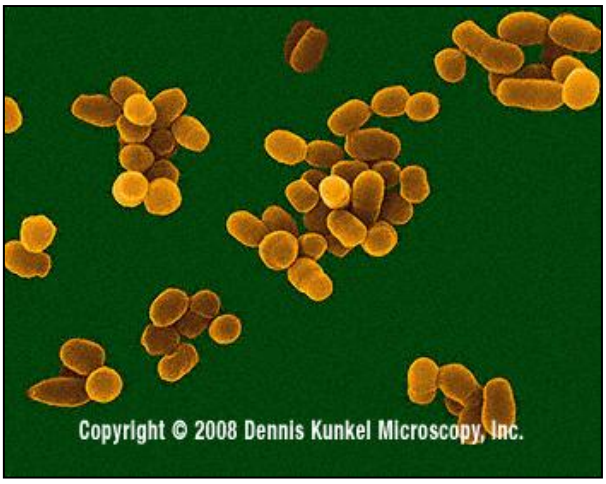


Figure 1.1 : *Brucella melitensis* (Kunkel, 2008)

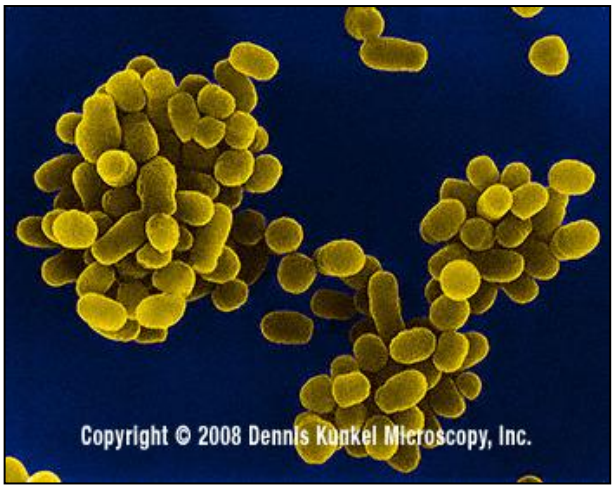


Figure 1.2 : *Brucella abortus* (Kunkel, 2008)

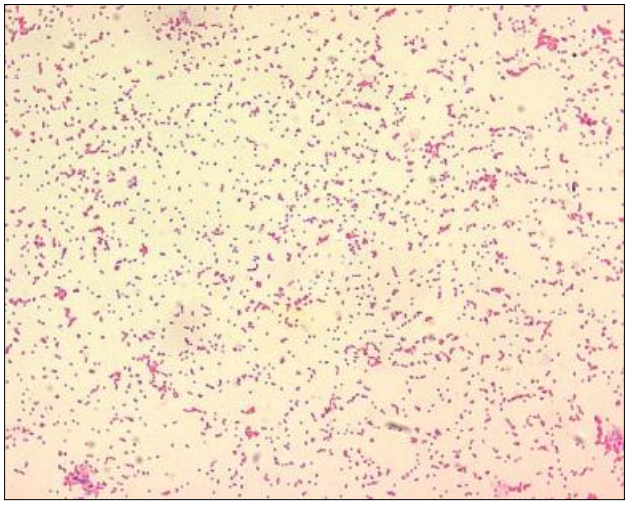


Figure 1.3 : *Brucella* spp. coloration de Gram (Stauffer, 2002)

1.3.2 Caractères culturaux

Les *Brucella* sont des bactéries aérobies strictes, certaines souches de *B. abortus* exigent une atmosphère enrichie de 5 à 10% de CO_2.
Leur croissance nécessite l'utilisation de milieux gélosés à base de peptone enrichis au sang (nécessite la présence de sérum en primoculture pour *B. abortus* bv 2). La thiamine, la niacine et la biotine sont des vitamines indispensables.
Certaines souches (*B. abortus*, *B. ovis* et *B. neotomae*) se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10% de CO_2. Le pH exigé pour la croissance des *Brucella* varie entre 6,6 et 7,4, toutefois le pH optimal se situe à **6,8**. La température de culture peut varier entre 20 et 37°C, la température optimale de croissance étant de **34°C**, bien que les *Brucella* soient habituellement cultivées à 37°C.
Les *Brucella* poussent difficilement et lentement sur les milieux de culture, nécessitant des temps d'incubation prolongé allant de 3 jours à 3 semaines (Lavigne et al, 2007; Maurin, 2007 ; Roux, 1984).

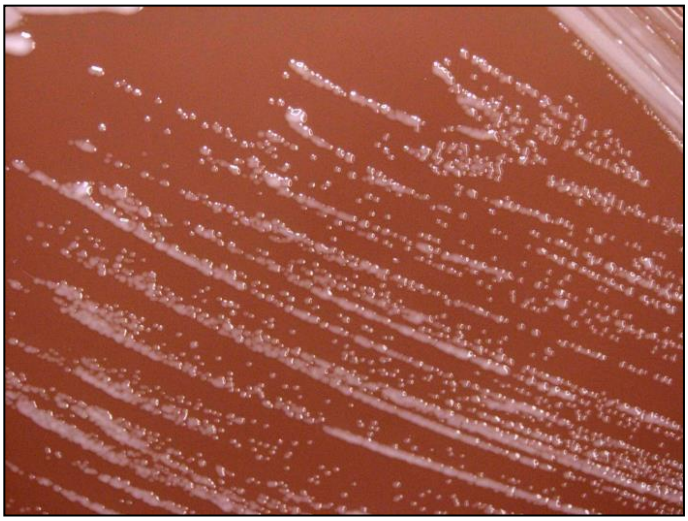


Figure 1.4 : Colonies de *B. abortus* sur gélose chocolat (Todd, 2014)

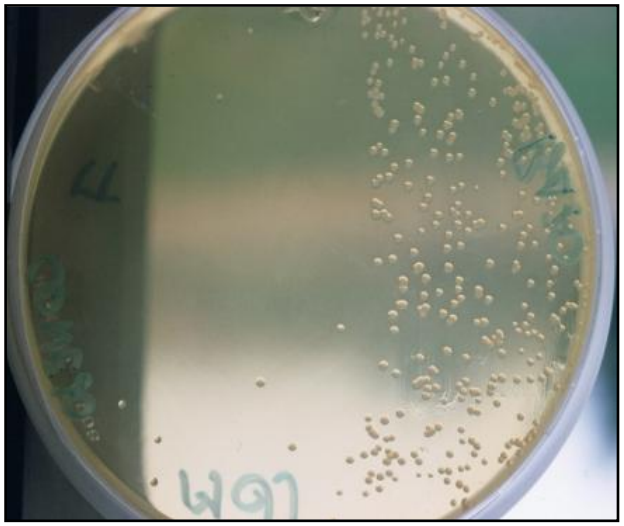


Figure 1.5 : Colonies de *Brucella* sur Milieu Farrell (Garin-Bastuji, 2004)

1.3.3 Caractères biochimiques

Les *Brucella* sont catalase positives, oxydase habituellement positives (sauf *B. ovis* et *B. neotomae*). La plupart des souches isolées en pathologie humaine produisent une uréase d'action rapide et intense.

Ces bactéries ne fermentent pas les sucres. La majorité des autres caractères métaboliques sont négatifs : production d'indole, réaction de Vosges-Proskauer, citrate de Simmons, etc. Par contre, *Brucella* ont une nitrate réductase positive (sauf *B. ovis*).
Du fait d'une faible réactivité biochimique, l'identification de ces bactéries par les méthodes phénotypiques usuelles est difficile. L'utilisation de galeries d'identification de type API-NE peut conduire à une fausse identification de *Moraxella phenylpyruvica* (Lavigne et al, 2007; Maurin, 2007 ; Roux, 1984).

Tableau 1.1 : Les différentes espèces et biovars du genre *Brucella*, leurs caractéristiques épidémiologiques et leur pouvoir pathogène chez l'homme (Maurin, 2005; Pappas, 2010)

Espèce	Biovars	Répartition géographique principale	Hôte animal habituel	Pathogénicité chez l'homme
B. abortus	1 à 6 et 9	Ubiquitaire	Bovins, ongulés sauvages	Modérée
B. melitensis	1 à 3	Bassin méditerranéen, moyen orient	Ovins, caprins, ongulés sauvages	Forte
B. suis	1 et 3	Amérique, Asie, Océanie	Suidés	Forte
	2	Europe centrale et occidentale	Suidés et lièvres	Faible
	4	Amérique du nord, Russie	Rennes	Modérée
	5	Russie	Rongeurs sauvages	Forte
B. canis		Ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du sud)	Chiens	Faible
B. ovis		Bassin méditerranéen	Ovins	Nulle
B. neotomae		Utah (états unis)	Rats du désert	Non connue
B. ceti		Non connue	Cétacés (dauphins)	Forte
B. pinnipedialis		Non connue	Pinnipèdes (phoques, otaries)	Forte
B. microti		Non connue	Renards roux, campagnol des champs (également isolée du sol)	Non connue
B. inopinata		Non connue	Inconnu	Forte
BO2		Non connue	Inconnu	Forte
B. papionis		Non connue	Babouins	Non connue

1.4 Caractéristiques génomiques des *Brucella*

Les propriétés du génome sont d'une importance primaire dans la définition du genre.

Sur la base de séquençage de l'ARN ribosomique 16S, le genre *Brucella* se trouve dans la sous-division α des Protéobactéries. Cette division regroupe des bactéries pathogènes ou symbiotes de plantes ou d'animaux, caractérisées par leur pouvoir pathogène intracellulaire (Michaux-Charachon et al., 2002). Ainsi, l'association de *Brucella* avec le groupe α-2 Protéobactéria vient soutenir sa possession de 2 chromosomes comme les autres membres du groupe.

Le génome de *B. melitensis* bv 1 de la souche de référence 16M fût caractérisé le premier comme étant le candidat prototype de *Brucella* spp. puis suivi par le génome de *B. suis* 1330 et peu après par le génome de *B. abortus* 9-941, et plus récemment B. ovis ATCC25840. D'autres génomes ont par la suite été séquencés, incluant *B. abortus* 2308 qui est largement utilisé dans la brucellose expérimentale, et *B. abortus* souche vaccinale S19, accumulant à ce jour 13 génomes de *Brucella* connus (pas tous publiés)(Banai and Corbel, 2010).

Il existe une extrême homogénéité entre les différentes souches de *Brucella*. Les techniques d'hybridation ADN/ADN mettent en évidence plus de 90% de similitude des séquences ADN entre les différentes espèces. En effet, la composition de l'ADN de *Brucella* montre une grande homogénéité des six espèces du genre *Brucella* caractérisée par un GC% compris entre 55 et 58, sauf pour *B. ovis* qui est dépourvu d'une petite proportion des séquences présentes dans les ADN des 5 autres espèces mais il partage néanmoins avec ces dernières une similitude supérieure à 90% (Banai and Corbel, 2010; Michaux-Charachon et al., 2002; Verger and Grayon, 1992).

Cette homogénéité génétique et l'absence de diversité antigénique pourraient s'expliquer par une caractéristique inhabituelle, à savoir l'absence de plasmide. Des plasmides natifs ou phages lysogènes n'ont en effet jamais été mis en évidence chez *Brucella* (Godfroid et al., 2003).

Il a été identifié dans le génome de *B. melitensis* 16M, la présence de deux chromosomes circulaires indépendants, de 1.15Mb et 2.12Mb (chromosome I plus grand que chromosome II)(DelVecchio et al., 2002). Les souches de référence des différentes espèces de *Brucella* possèdent toutes la même organisation génomique, sauf pour *B. suis* bv 3 qui comprend qu'un seul chromosome circulaire de 3.2 Mb. Il a été rapporté que les deux chromosomes avaient un contenu G+C similaire d'environ 57.1% pour le chromosome I et de 57.3% pour le chromosome II.

Le chromosome I code pour la machinerie métabolique de base comme les processus de transcription, traduction et la synthèse protéique. Au contraire, le chromosome II code pour les processus impliqués dans le transport membranaire, la régulation et le métabolisme énergétique (Banai and Corbel, 2010; Maurin, 2007; Michaux-Charachon et al., 2002; Verger and Grayon, 1992).

Il a été montré que le génome de *Brucella* est très stable, et que pour une espèce donnée ou pour un biovar donné à l'intérieure d'une espèce, il existe un profil de restriction spécifique. Cette stabilité a été confirmée par la constitution des cartes physiques des deux chromosomes composant le génome des souches types d'espèces et de biovars : ces cartes sont très conservées dans l'ensemble (Michaux-Charachon et al., 2002).

Le transfert horizontal des gènes au sein du genre *Brucella* reste hypothétique. Par contre, une séquence d'insertion (IS711 ou IS6501) a été identifiée. Six à dix copies de cette IS ont été mises en évidence chez toutes les espèces de *Brucella* sauf chez *B. ovis* et chez *B. ceti*, qui en contiennent plus de 25 copies. Cette caractéristique pourrait être utilisée dans le typage moléculaire de *Brucella* (Godfroid et al., 2003).

1.5 Sensibilité aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité des *Brucella* aux antibiotiques nécessite l'utilisation de techniques adaptées aux exigences de croissance de ces bactéries. In vitro, les *Brucella* sont sensibles certaines bêta-lactamines : les pénicillines A, les cephalosporines de troisième génération (céfotaxine et ceftriaxone), l'imipenème. Les macrolides sont modérément actifs, l'azithromycine étant le plus actif d'entre eux (CMI_{90}= 0.5-1 mg/L). Le chloramphénicol est peu actif. Les antibiotiques les plus actifs sont les aminosides (streptomycine et gentamicine), les tétracyclines, la rifampicine et les fluoroquinolones. Seuls les aminosides, les tétracyclines et la rifampicine possèdent une activité bactéricide in vitro.

La résistance acquise à ces antibiotiques est rare en clinique. Il est aisé de sélectionner in vitro des mutants résistants à la rifampicine.

Les études concernant l'activité des antibiotiques vis-à-vis des *Brucella* intracellulaires sont peu nombreuses et souvent anciennes. Elles ont montré notamment la faible activité intracellulaire de la streptomycine, comparée à son activité extracellulaire. Au contraire la rifampicine conserve une activité intracellulaire bactéricide. La faible activité des antibiotiques vis à vis des *Brucella* intracellulaires pourrait être liée à leur inactivation par l'acidité du compartiment de multiplication de ces bactéries.

Les modèles animaux (notamment la souris ou le cobaye infectés par *B. abortus*) ont également permis de monter l'efficacité des aminosides (streptomycine), des tétracycline et de la rifampicine in vivo, de même que la supériorité de leur associations par rapport à une monothérapie. Les fluoroquinolones sont inactives chez l'animal en monothérapie (Maurin, 2007).

Tableau 1.2 : Antibiotiques actifs *in vitro* et efficacités *in vivo* sur *Brucella* spp. (Lavigne et al, 2011)

Familles d'antibiotiques actives *in vitro*	**Efficacité *in vivo***	**Molécules à utiliser**
ß-lactamines	+	Pénicilline A, céphalosporines de 3^{e} génération (céfotaxime et ceftriaxone), imipénème
Macrolides	+	Azithromycine, érythromycine
Chloramphénicol	+	Chloramphénicol
Sulfamides	V^{a}	Cotrimoxazole
Aminosides	+++	**Gentamicine**, nétromycine, tobramycine, **streptomycine**
Tétracyclines	++++	**Doxycycline**
Rifampicine	+++	**Rifampicine**
Fluoroquinolones	++	**Ciprofloxacine, ofloxacine**

V^{a} : variable en fonction des espèces ; en gras les antibiotiques recommandés par l'OMS.

CHAPITRE 2
ETUDE CLINIQUE DES BRUCELLOSES

CHAPITRE 2
ETUDE CLINIQUE DES BRUCELLOSES

2.1 Brucellose bovine

2.1.1 Espèces de *Brucella* en cause

Le principal agent de la brucellose bovine est *B. abortus*. Les bovins peuvent aussi être infectés par *B. melitensis* et *B. suis* quand ils partagent les mêmes pâturages et les mêmes installations que des caprins, ovins ou porcs infectés. Une souche brucellique hétérologue peut provoquer une maladie plus éphémère que celle causée par *B. abortus*. Cependant, ces infections croisées représentent une sérieuse menace pour la santé publique, parce que ces *Brucella*, qui sont hautement pathogènes pour l'homme, peuvent passer dans le lait de vaches.
L'infection par *B. suis* est assez rare. En revanche, on a observé dans plusieurs pays des infections à *B. melitensis,* qui ont une évolution similaire à celle dues à *B. abortus* (Acha and Szyfres, 2005).

2.1.2 Période d'incubation

a) Chez la femelle

Lors d'une infection naturelle, comme il n'est pas possible de déterminer le moment où elle se produit, il est difficile d'évaluer le temps d'incubation de la maladie (de l'infection à l'avortement ou à la naissance prématurée). On a démontré expérimentalement, que la période d'incubation varie considérablement et qu'elle est inversement proportionnelle au développement du fœtus : plus la gestation est avancée, plus la période d'incubation est courte. Si la femelle est infectée par voie orale pendant la période de fécondation, l'incubation peut durer quelques 200 jours, tandis que si elle est exposée six mois après la conception, l'incubation est approximativement de deux mois. La période d'«incubation sérologique » (de l'infection à la première détection d'anticorps) peut aller de plusieurs semaines à plusieurs mois.
L'incubation varie en fonction de facteurs tels que la virulence et la dose infectante de bactéries, la voie d'inoculation et la réceptivité de l'animal.

b) Chez le mâle

La période d'incubation chez les taureaux n'a pas été clairement déterminée. On a observé des orchites dues à la souche vaccinale *B. abortus* 19, dix jours ou à 7 mois après la vaccination (Megid et al., 2010).

2.1.3 Symptômes

a) Chez la femelle

Le symptôme prédominant chez les femelles gestantes est l'avortement ou la mise bas, prématurée ou à terme, de veaux mort-nés ou affaiblis. En général, l'avortement se produit pendant la seconde moitié de la gestation (du $5^{ème}$ au $7^{ème}$ mois), souvent avec rétention placentaire, provoquant une métrite, qui peut conduire à une stérilité permanente. On estime que l'infection occasionne des pertes en production laitière de 20 à 25%, par suite de l'interruption de la lactation due à l'avortement et de la fécondation différée.

Les femelles non gravides ne présentent pas de symptômes cliniques et, si elles sont infectées avant d'être saillies, il est fréquent qu'elles n'avortent pas. Un nombre significatif de vaches non gestantes semblent résister à l'infection.

La brucellose bovine est une infection chronique. Bien qu'une vache malade n'avorte, en général, qu'une fois, elle reste infectée et peut excréter des bactéries dans le lait et les sécrétions du tractus génital au cours d'un vêlage ultérieur, apparemment normal. Le fœtus bovin est, quant à lui, remarquablement sensible à l'infection brucellique. 2,5 à 9% des jeunes femelles peuvent être infectées in utéro ou à la naissance et ne présentent des symptômes que lors d'une gestation ultérieure, à savoir un avortement au $6^{ème}$ ou $7^{ème}$ mois de gestation.

Parfois une réaction inflammatoire interstitielle légère peut être observée dans la glande mammaire, qui est associée à l'excrétion des bactéries dans le lait. Les macrophages des glandes mammaires peuvent fournir un environnement intracellulaire favorable pour la persistance de *B. abortus* dans la glande mammaire des vaches infectées de façon chronique (Megid et al., 2010).

Figure 2.1 : avorton de buffle due à une infection à *Brucella abortus* biovar 1 (Megid et al., 2010)

b) Chez le mâle

Chez les taureaux, les *Brucella* se localisent dans les testicules et les autres organes génitaux. La maladie se manifeste par l'hypertrophie d'un ou des deux testicules (orchite), entrainant la diminution de la libido et l'infécondité. Parfois un testicule peut s'atrophier par suite d'adhérences et de fibrose. L'infection de l'épididyme, des vésicules séminales et de la prostate est fréquente. Des hygromas et de l'arthrite sont parfois observés (Acha and Szyfres, 2005; Megid et al., 2010).

Figure 2.2 : Nécrose du testicule (droit) chez un taureau atteint d'une orchite unilatérale due à *Brucella abortus* (Megid et al., 2010).

Des hygromas uni- ou bilatéraux, en particulier au niveau de l'articulation du carpe peuvent se rencontrer chez 66% des animaux lors d'infection chronique (Godfroid et al., 2003).

Figure 2.3 : Hygroma au niveau de l'articulation du carpe gauche d'un buffle africain (Godfroid et al., 2003).

2.1.4 Evolution dans l'élevage

Dans un même troupeau, chaque animal manifeste une sensibilité variable à l'infection selon l'âge et le sexe, mais il existe aussi une sensibilité individuelle. Même dans les catégories les plus sensibles, certain animaux ne sont jamais infectés ou, s'ils le sont, la maladie est passagère.

Dans un troupeau jusque-là indemne, la brucellose se propage d'animal à animal, et pendant un an ou deux, les pertes sont sévères du fait des avortements, de la stérilité et de la chute de production de lait, ainsi que des infections génitales secondaires. La phase active ou aigue de la maladie est caractérisée par un grand nombre d'avortements et par un grand pourcentage élevé d'animaux réagissant aux épreuves sérologiques. A cause des variations individuelles de sensibilité, tous les animaux ne sont pas infectés, et tous ceux qui ont une sérologie positive n'avortent pas.

Au bout d'un an ou deux, la situation se stabilise et le nombre d'avortements décroit. On estime que 10 à 25% des vaches avortent une seconde fois. Lors de cette phase de stabilisation, ce sont principalement les génisse-non encore exposées à l'infection qui se trouvent infectées et avortent.

Dans une dernière phase, on observe une phase de déclin dans les petits troupeaux fermés. Dans cette phase, le taux d'infection diminue graduellement, et les fonctions de reproduction et de lactation redeviennent normales chez la plupart des vaches. Cependant, quand il y a un nombre suffisamment important d'animaux sensibles, constitué par les génisses issues du

troupeau ou achat, une deuxième épizootie peut se déclarer. Dans les troupeaux important où il y a toujours assez d'animaux sensibles pour entretenir l'infection, les avortements se poursuivent. Le transport des animaux contribue aussi à maintenir l'infection active (Acha and Szyfres, 2005).

2.2 Brucellose humaine

2.2.1 Espèces de *Brucella* en cause

L'homme est sensible par ordre décroissant aux infections dues à *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* et *B. canis*. Aucun cas humain dû à *B. ovis*, *B. neotomae* ou *B. suis* bv 2 et 5 n'a été confirmé (Acha and Szyfres, 2005; Lavigne and O'Callaghan, 2011). Les espèces marines ainsi que *B. inopinata* sont également pathogènes pour l'homme. La pathogénicité pour l'homme, des autres nouvelles espèces de *Brucella* reste encore inconnue (Lavigne and O'Callaghan, 2011; Pappas, 2010).

2.2.2 Période d'incubation

Il est difficile de déterminer la durée de la période d'incubation dans les régions endémiques où les patients sont continuellement exposés au risque d'infection par *Brucella*. La période d'incubation peut varier selon la virulence de la souche, la voie d'entrée et la dose infectante. La plus part des auteurs estime en moyenne la période d'incubation d'une à trois semaines, mais elle peut parfois atteindre plusieurs mois (Acha and Szyfres, 2005; Madkour, 2001).
La dose minimale infectante capable d'induire une brucellose active dépend de l'espèce de *Brucella* et de la voie d'entrée (voir tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Dose infectante des espèces de *Brucella* (Madkour, 2001)

Espèces	**Nombre de bactéries**	
	Voie orale	**Inhalation**
B. melitensis	5000	1300
B. abortus	106	<100
B. suis	107	<100

2.2.3 Symptômes

Le spectre de la brucellose humaine varie de la forme sub-clinique insidieuse à la forme chronique. Les manifestations cliniques peuvent se présenter selon différentes formes :

- Brucellose asymptomatique ;
- Brucellose aigue ;
- Brucellose récurrente ;
- Brucellose focalisée ;
- Brucellose chronique (Moyer and Holcomb, 1988; Young and Hall, 1998).

La maladie est septicémique ; elle peut s'installer soudainement ou de façon insidieuse et s'accompagne d'une fièvre continue, intermittente ou irrégulière. La brucellose aiguë se manifeste par des frissons, une sudation abondante et une forte température. Un symptôme pratiquement constant est la faiblesse, la température peut monter à 40°C, les sueurs, à l'odeur caractéristique, sont nocturnes. Les symptômes courants sont l'insomnie, l'impuissance sexuelle, la constipation, l'anorexie, les céphalées, de l'arthralgie et des douleurs généralisées. Cette maladie a un effet marqué sur le système nerveux, se traduisant par de l'irritation, une nervosité et un état dépressif. De nombreux patients présentent une adénopathie périphérique ou une splénomégalie, souvent une hépatomégalie.
La durée de la maladie peut varier de quelques semaines ou quelques mois à plusieurs années. La thérapeutique moderne a considérablement réduit la durée ainsi que la fréquence des rechutes. Des complications sérieuses peuvent parfois se produire : encéphalite, méningite, névrite périphérique, spondylite, arthrite suppurée, endocardite végétante, orchite, spermatocystite et prostatite. Chez certains malades, on observe une forme chronique de la maladie qui peut durer plusieurs années, avec ou sans foyers d'infection localisé. Les symptômes sont associés à un état d'hypersensibilité. Le diagnostic de la brucellose chronique est difficile (voir tableaux 2.2 et 2.3) (Acha and Szyfres, 2005; Madkour, 2001; Moyer and Holcomb, 1988; Young and Hall, 1998).
Dans les régions où la brucellose, particulièrement la brucellose bovine, est enzootique, les cas d'infection asymptomatique sont nombreux.

Bien que *Brucella* est une cause importante des avortements en élevage, son rôle lors de la grossesse chez la femme constitue un débat (Hoover, 2004). Une étude récente en Arabie Saoudite indique une incidence, des avortements spontanés chez la femme enceinte avec une brucellose, au cours du premier et du second trimestre de 43% et une incidence de mort fœtal intra-utérine de 2% ; un traitement antibiotique réduit considérablement le risque d'avortement (Khan et al., 2001). Une autre étude en Turquie rapporte des taux d'avortements spontanés, de mort fœtal intra-utérine et des accouchements prématurés, de 24.14, 3.45 et 6.9% respectivement (Kurdoglu et al., 2010).

Tableau 2.2 : Signes généraux et symptômes de la brucellose (Hoover, 2004)

Symptômes	Fréquence (%)
Fièvre	94 -100
Malaise	82- 95
Frissons	39- 95
Sueurs	39- 93
Céphalée	29- 77
Myalgie	39- 68
Mal de dos	15-73
Arthralgie	17-77
Anorexie	25-52
Perte de poids	13-50

Tableau 2.3 : Brucellose focalisée (Hoover, 2004)

Système	Anomalie	Fréquence (%)
Musculo-squelettique	Aucune	5-37
	Spondylite	2-13
	Sacro-iliite	7-19
Phagocyte mononucléaire	Hépatomégalie	37-66
	Splénomégalie	10-60
	Lymphadénopathie	9-20
	Enzymes hépatiques	37-49
Cardiaque	Endocardite	1-2
Nerveux	Méningite	0-1
Génito-urinaire	Epididymo-orchite	2-10

2.2.4 Brucellose humaine due aux souches vaccinales

L'infection humaine par la souche vaccinale 19 de *B. abortus* due à des cas de contamination accidentelle ont été décrit chez ceux qui administrent le vaccin (vétérinaires, assistants), soit par piqûre, soit par projection d'aérosols dans les yeux. La maladie provoquée par le vaccin est généralement moins grave que l'infection naturelle, bien que les symptômes habituels d'une brucellose aigue sont observés (Acha and Szyfres, 2005; Moyer and Holcomb, 1988). La souche Rev 1 de *B. melitensis* peut également infecter le vaccinateur (Acha and Szyfres, 2005).

2.2.5 Traitement de la brucellose humaine

Les antibiotiques doivent être choisis en envisageant non seulement leur action à l'égard de *Brucella* en position extracellulaire, mais aussi leur pouvoir de pénétration à l'intérieur des cellules. L'antibiothérapie ne vise pas la stérilisation bactériologique pratiquement jamais obtenue; elle a pour but la seule réduction du nombre des *Brucella* viables intracellulaires, l'organisme achevant lui-même le processus de guérison. *Brucella* est très sensible *in vitro* à la plupart des agents antibactériens. Mais parmi ceux-ci, il convient de choisir ceux qui présentent la propriété de pénétrer dans les foyers ganglionnaires et viscéraux et de forcer la barrière cellulaire. Les antibiotiques antibrucelliens sont:

- **Les tétracyclines:** sont considérés comme les meilleurs des antibrucelliens bien qu'essentiellement bactériostatiques. On peut utiliser soit la tétracycline base à la dose de 2 à 3 g/j, soit les cyclines de 2ème génération (doxycycline, minocycline) à la dose de 200 à 300 mg/j.
- **La rifampicine:** est d'une excellente pénétration cellulaire et tissulaire, bactéricide et administrée à une dose de 900 mg/j toujours en association afin d'éviter tout risque de mutation.
- **Le triméthoprime-sulfamethoxazole:** possède une bonne pénétration dans les tissus infectés.
- **La streptomycine:** a une action synergique avec les tétracyclines. Elle potentialise l'action des cyclines. Cependant lors de résistance, on préconise l'utilisation de gentamicine ou kanamycine (Ouar-Korichi, 1997 ; Redjah, 1990).

C'est l'expérience clinique qui a permis l'élaboration des protocoles thérapeutiques actuellement préconisés par l'OMS. En particulier, il est apparu très tôt que l'utilisation d'un traitement antibiotique en monothérapie et/ou de courte durée était liée à un taux élevé d'échecs thérapeutiques ou de rechutes à l'arrêt du traitement. Ces données ont été confirmées récemment concernant l'utilisation en monothérapie de céphalosporines de troisième génération ou des fluoroquinolones. Le premier protocole thérapeutique de la brucellose aiguë non focalisée, préconisé par l'OMS en 1965, correspondait à l'association de la tétracycline (500 mg × 4 fois/jour per os, pendant quatre à six semaines) à la streptomycine (1 g/jour en injection intramusculaire, pendant les deux premières semaines), avec un taux de rechutes réduit à moins de 10 %. La doxycycline (200 mg/jour en 1 à 2 fois, per os) a remplacé ensuite la tétracycline. En 1986, l'OMS a proposé comme deuxième alternative l'association de la doxycycline (200 mg/jour) à la rifampicine (600 à 900 mg/jour) pendant six semaines. Toutefois, cette association est considérée comme d'efficacité inférieure à la précédente en cas de localisation ostéoarticulaire. La gentamicine (5 mg/kg/jour, en une injection journalière, 7 à 10 jours) a été proposée comme alternative à la streptomycine. Plus récemment, l'association d'une fluoroquinolone à la rifampicine s'est avérée aussi efficace que celle de la doxycycline à la rifampicine. Plusieurs alternatives sont préconisées chez l'enfant avant l'âge de 8 ans, du fait du risque de coloration permanente des dents par les tétracyclines : le cotrimoxazole (80 mg de triméthoprim/kg par jour × 2 fois/jour) pendant 45 jours associé à la streptomycine (30

mg/kg par jour, IM en 1 fois/j) pendant 21 jours ou à la gentamicine (5 mg/kg/jour, IM en 1 fois/jour) pendant 7 jours ; la rifampicine (15 mg/kg/jour) associée au cotrimoxazole ou à la streptomycine. Le cotrimoxazole seul ou en association avec la rifampicine est également utilisé chez la femme enceinte, du fait de la contre-indication à la fois des tétracyclines, des aminosides et des fluoroquinolones. Le traitement optimal des formes focalisées de brucellose demeure à établir. Il est actuellement fondé sur l'administration des mêmes associations d'antibiotiques que pour la brucellose non focalisée, avec cependant une durée de traitement de deux à trois mois minimum à plus de six mois (Maurin, 2005).

En Algérie, le ministère de la santé et de la population conseille l'association doxycycline (200mg/j) pendant 6 semaines associé à la gentamycine (80mg) 2 fois/jour en IM pendant 2 semaines. Pour l'enfant moins de 8 ans, l'association rifampicine-aminoside (gentamycine) (Ouar-Korichi, 1997), dont l'efficacité est prouvée par une étude de ZVALA et al. (1997). Pour les complications: brucellose chronique; tétracycline associée aux aminosides pendant 3-6 mois. Doxycycline associée à la rifampicine pendant 3-6 mois (Ouar-Korichi, 1997).

CHAPITRE 3
EPIDEMIOLOGIE DE LA BRUCELLOSE

CHAPITRE 3
EPIDEMIOLOGIE DE LA BRUCELLOSE

3.1 Distribution de la brucellose bovine dans le monde

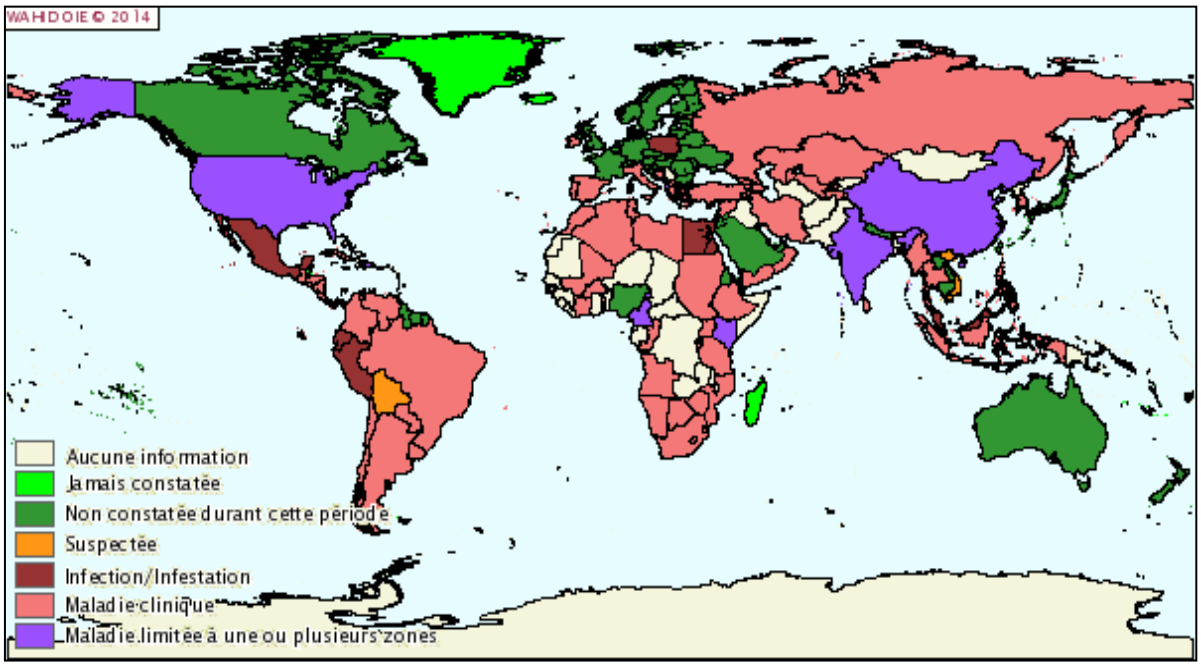


Figure 3.1 : Distribution de la brucellose bovine dans le monde en 2005 (WAHID, 2014)

La répartition géographique de la brucellose est mondiale. La distribution des différentes espèces de *Brucella* et de leurs biotypes varie avec la zone géographique. *B. abortus* est le plus répondu ; *B. melitensis* et *B. suis* ont une répartition irrégulière (Acha and Szyfres, 2005).

La brucellose bovine est retrouvée dans le monde entier, elle a été éradiquée dans certains pays, mais de très nombreux pays sont encore infectés avec une prévalence et une incidence variable selon les régions. En effet, les taux d'infection varient beaucoup d'un pays à l'autre, et entre les régions d'un même pays (Acha and Szyfres, 2005). La situation zoo-sanitaire internationale relative à la brucellose bovine évolue en effet continuellement du fait des échanges mondiaux et de l'évolution des programmes de surveillance nationaux (Godfroid et al., 2003).

Les séroprévalences rapportées chez les bovins se situent entre **3 et 15%**. Les facteurs influençant la prévalence incluent le système de production, les zones agro-écologique, les pratiques d'élevage, le contact avec la faune sauvage et la gestion de l'élevage (Godfroid et al., 2011).

Malgré les avancées réalisées en matière de surveillance et de contrôle, la prévalence de la brucellose a augmenté dans plusieurs pays en développement, ce qui est dû à divers facteurs sanitaires, socioéconomiques et politiques(Gwida et al., 2010).

L'infection des bovins par *B. abortus* est de répartition mondiale, mais la maladie est considérée comme éradiquée au Canada, en Australie, en Nouvelle- Zélande, au Japon, en Israël et dans certains pays d'Europe occidentale et septentrionale (Acha and Szyfres, 2005; Maurin, 2005). Les pays méditerranéens de l'Europe, le nord et l'est de l'Afrique, l'Afrique subsaharienne, le Moyen Orient, l'Inde, la Chine, l'Asie centrale, le Mexique, l'Amérique centrale et du sud ne sont pas indemnes de brucellose (Seleem et al., 2010).

3.1.1 En Amérique

Aux **Etats Unis d'Amérique,** en 2008, les 50 états ont été simultanément classés comme indemnes de brucellose chez les bovins. Mais une réinfection du bétail par *B. abortus* provenant de réservoirs de la faune sauvage a causé la perte du statut indemne de brucellose d'un Etat. L'éradication totale de la brucellose du bétail domestique dépendra de l'élimination de la maladie les réservoirs sauvages. En effet, les États-Unis possèdent deux hôtes réservoirs primaires de *B. abortus* : les bisons (*Bison bison*) et le wapiti (*Cervus elaphus*)(Olsen, 2010). Les biotypes 1, 2 et 4 ont été isolés (Acha and Szyfres, 2005).

Au **Mexique**, la brucellose bovine est causée exclusivement par *B. abortus*. Dans certaines régions, la coexistence de bovins et petits ruminants (essentiellement des caprins) facilite l'infection des bovins par *B. melitensis*. La prévalence individuelle et cheptel varient d'une région à une autre, allant de 0 à 5,68% et de 0 à 17,3%, respectivement (Luna-Martínez and Mejía-Terán, 2002).

En **Amérique centrale**, *Brucella abortus* biovar 1 et 2 sont les seules biotypes identifiés en Amérique centrale. Basé sur des dépistages sérologiques limités réalisés durant la dernière décennie, la prévalence individuelle de la brucellose bovine est estimée entre 4 à 8%, et la prévalence cheptel (principalement les élevages laitiers) entre 10 to 25% (Moreno, 2002).

Au **Venezuela**, l'espèce la plus répondue est *B. abortus*, mais *B. melitensis* a été isolée. La prévalence officiellement rapportée est entre 0.8 et 1.2%. Mais des études dans différentes régions, réalisées avec différents tests sérologiques rapportent une moyenne de 10,5% (ELISA), 8,5% (FC) et 0,5 (EAT) (Francisco J., 2002).

Au **Brésil**, selon les rapports officiels, la prévalence de la brucellose bovine variait de 4 à 5%, de 1989 à 1998. Les données officielles rapportent une situation endémique relativement stable avec une prévalence plus élevée dans les régions à forte densité de bétail. Il est intéressant de souligner que la brucellose bovine est très répandue dans les troupeaux de

boucherie. Quelques études révèlent l'existence des biovars 1, 2 et 3 de *B. abortus*, ainsi que *Brucella suis* chez les bovins (Poester et al., 2002).

Au **Paraguay**, les résultats d'une large enquête chez le bovin réalisée de 1979 à 2000, rapporte une prévalence individuelle qui varie de 3 à 4%. La dernière estimation de la prévalence de *B. abortus* chez les bovins est de 3,15%. *B . abortus* biovar 1 a été isolée chez le bovin, *B. melitensis* bv 1 et 2 ainsi que *B. suis* bv 1 ont été identifiées (Baumgarten, 2002).

En **Argentine,** la maladie est endémique, en effet le résultat d'une enquête nationale sur la brucellose effectué en 2004, indique que 12,4% (IC à 95%: de 10,89 à 14,0) des fermes bovines sont séropositifs et que la prévalence apparente chez les bovins est de 2,10% (IC 95%: 1,90 à 2,40) (Aznar et al., 2014). La plupart des isolats correspondent à *B. abortus* bv 1, cependant *B. abortus* bv 2 a été identifiée, ainsi que *B. suis* bv 1 chez les bovins (Godfroid et al., 2011; Samartino, 2002).

La prévalence de la brucellose bovine dans les pays limitrophes est très variable: 0,04% en **Uruguay**, 10,20% dans le nord et 0,06% dans le sud du Brésil, de 0,2% au **Chili** et 2,27% en **Bolivie** (Aznar et al., 2014). *Brucella abortus* biovar 1 est le biovar le plus répondu en Amérique Latine (Díaz Aparicio, 2013).

3.1.2 En Asie

En **Chine**, la brucellose a été rapportée dans 25 des 32 provinces. De 1992 à 1999, le taux d'infection chez les animaux domestiques était de 0.04–0.9%. Selon les régions, la souche prédominante était *B. melitensis* avec *B. abortus* et/ou *B. suis*. *B. melitensis* 1, 2, 3; *B. abortus* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 et *B. suis* 1, 3 ont été identifiés (Deqiu et al., 2002).

En **Inde**, les études sérologiques suggèrent que la brucellose est fortement endémique dans la plupart des régions. La séroprévalence varie de 6,6% dans l'état central de Madhya Pradesh à 60 % dans l'état nord est d'Assam. Le dépistage national de 1994 à 2001, rapporte un taux moyen de 5% chez les bovins. *Brucella abortus* 1, 3, 4, 6 et 9 ; *B. melitensis* 1 et 2 et *B. suis* ont été identifiés (Renukaradhya et al., 2002).

En **Russie**, la brucellose est toujours rapportée de tous les types d'élevages et animaux domestiques, infectés par *B. abortus, B. melitensis* et *B. suis.* Entre 1999 et 2009, le nombre de sites infectés a légèrement augmenté, variant entre 54 en 2001 à 112 en 2009. Grace à l'utilisation du vaccin *B. abortus* 82 à travers la Russie, le nombre de sites infectés par la maladie a considérablement diminué et beaucoup de régions sont maintenant classés comme exempt de brucellose bovine (Denisov et al., 2013).

Au **Moyen Orient**, la brucellose est connue depuis plus d'un siècle. La maladie a été rapportée chez des animaux dans presque tous les pays de la région. Un taux d'incidence élevé a été rapporté en particulier de plusieurs fermes laitières modernes. Le taux d'infection dans ces fermes nouvellement créées a atteint dans certains pays plus de 30% des bovins. Le taux d'infection le plus élevé (72,9%) a été signalé dans l'Autorité palestinienne (Refai, 2002). *Brucella melitensis* biovar 3 est l'espèce la plus fréquemment isolés chez les animaux en

Egypte, Soudan, Jordanie, Syrie, Israël et en Turquie. *B. melitensis* biovar 2 a été signalé en Turquie, Palestine, Jordanie, Syrie et en Arabie saoudite, et *B. melitensis* biovar 1 en Libye, Oman, Jordanie, Syrie, Palestine et Israël. *B. abortus* biovar 1 a été rapportée en Egypte, le biovar 2 en Iran, le biovar 3 en Iran et en Turquie, et le biovar 6 au Soudan (Benkirane, 2006; Refai, 2003).

3.1.3 En Europe

La plupart des pays d'Europe sont indemnes de brucellose bovine comme: la Norvège, la Suède, la Finlande, le Royaume-Uni, le Danemark, les Pays-Bas, l'Allemagne, la Suisse, la Belgique (à l'exception de foyers bovins détectés en 2012, le cheptel belge est indemne de brucellose), l'Autriche, la Hongrie, la Tchéquie , la Roumanie, la Bulgarie et Chypre (Acha and Szyfres, 2005; Seleem et al., 2010).

La situation est moins favorable dans les pays méditerranéens ou du sud de l'Europe où la brucellose demeure endémique au Portugal, en Espagne, en Italie, en France et en Grèce. Dans ces régions, des cas d'infection bovine avec *B. melitensis* ont été observés dans les élevages mixtes avec des petits ruminants.

Il en est de même dans les pays de l'Est et du centre de l'Europe tel que : Andorre, la Macédoine, la Croatie, la Yougoslavie, l'Albanie, l'Arménie, Azerbaïdjan, la Bosnie et l'Herzégovine (Benkirane, 2006; Godfroid et al., 2011; Maurin, 2005; Taleski et al., 2002).

En 2012, 16 états étaient déclarés comme OBF (officially brucellosis free) de brucellose bovine. Certaines régions et provinces en Italie, en Espagne et au Portugal ainsi que l'Angleterre, Ecosse, Pays de Galles et l'île de Man, au Royaume-Uni, étaient OBF.

Au niveau de l'Union Européenne, la prévalence de la brucellose bovine dans les troupeaux de bovins a diminué, en 2012, seulement 0,05% des troupeaux bovins existants étaient infectés. En 2012, la brucellose bovine était rare aussi dans les états non-OBF (0,09%) (European Food Safety Authority, 2014).

La **France** est OBF depuis 2005 et aucun cas de brucellose n'a été rapporté chez les ruminants domestiques depuis 2003. Pourtant en 2012, un foyer de brucellose bovine dû à *B. melitensis* bv 3 a été détecté dans les Alpes, une étude a démontré que cette recrudescence pourrait provenir de la population bouquetins sauvages en contact avec les bovins dans cette région (Mick et al., 2014).
Il est intéressant d'indiquer que la très grande majorité des souches isolées chez le bovin en France, durant les années précédentes appartiennent à l'espèce *B. abortus.* Les biovars les plus souvent rencontrés sont le biovar 3 et 4 et, plus rarement le biovar 1. Le biovar 3 est distribué largement sur le territoire alors que le biovar 4 est cantonné au Massif central. *B. melitensis* bv 3, était très fréquent par le passé dans les foyers bovins du sud (Garin-Bastuji and Delcueillerie, 2001).

Tableau 3.1: Infections à *Brucella* recensées en Europe depuis 1994 (Godfroid and Käsbohrer, 2002)

Pays	Infection des bovins (*B. abortus* ou *B. melitensis*)	Brucelloses humaines déclarées de 1995 à 2000
Norvège	OBF [a]	2 [b]
Finlande	OBF	1
Suède	OBF	15
Danemark	OBF	0
Hollande	OBF	13
Allemagne	OBF	163
Grande Bretagne	OBF	61
Irlande	non-OBF	154 [c]
Belgique	non-OBF	14
France	non-OBF	330
Autriche	OBF	10
Italie	non-OBF	7584
Espagne	non-OBF	11 102
Portugal	non-OBF	4589
Grèce	non-OBF	1799

[a] OBF : pays officiellement exempt de brucellose bovine.
[b] Années 1999 et 2000 seulement.
[c] Forte prédominance en Irlande du sud.

3.1.4 En Afrique

En **Afrique subsaharienne**, la brucellose est souvent méconnue voire négligée par manque de prise en considération ou simplement par manque de structures de diagnostic adaptées. Les données sur la prévalence réelle de la brucellose sont rares et fragmentaires. Chez les bovins, tous les biotypes de 1 à 6 et une souche intermédiaire nommée 3/6 de *Brucella abortus* ont été

isolés avec une prépondérance des biotypes 3 ou 3/6. *Brucella abortus* biotype 3 est la souche la plus fréquemment rencontrée, isolée dans plusieurs pays, notamment au Sénégal, en Côte d'Ivoire, au Niger, au Cameroun, au Togo, au Tchad, au Rwanda, au Kenya et en Ouganda (Boukary et al., 2014). Récemment, *Brucella melitensis* biovar 1 a été isolé dans du lait de vache au Kenya (Muendo et al., 2012).

Les différents auteurs ont noté que les souches de *Brucella* africaines se différenciaient des souches européennes par une croissance plus lente et un profil métabolique oxydatif particulier par rapport au profil classique de l'espèce. À quelques exceptions près, ces souches ne répondaient pas à l'épreuve de l'oxydase et leur profil moyen d'oxydation métabolique était modifié au niveau de quatre des substrats conventionnels.

La séroprévalence globale de la brucellose bovine est estimée à 16,2 % avec toutefois des variations très importantes allant de 10,2 % à 25,7 %. Globalement, les différentes investigations menées sur la maladie ont montré que la prévalence de la brucellose animale tant au niveau individuel qu'au niveau des troupeaux varie selon les systèmes d'élevages, les zones géographiques considérées et les méthodes de diagnostic utilisées. On distingue :

- des pays à prévalence relativement très forte allant de 18 à 25 % comme le Mali, la Côte d'Ivoire, le Niger, le Togo, le Rwanda et la Zambie ;
- des pays à prévalence relativement forte, allant de 12,5 à 18 % comme le Sénégal, le Burkina Faso, le Tchad, le Soudan, la République démocratique du Congo et le Burundi ;
- des pays à prévalence relativement moyenne allant de 6,5 à 12,5 % qui sont : le Ghana, le Bénin, le Nigeria, le Cameroun, la Somalie, l'Ouganda, le Kenya et la Tanzanie ;
- et enfin des pays à prévalence relativement plus faible allant de 3 à 6,5 % comme la Guinée, la République Centre Africaine, l'Ethiopie et l'Erythrée (Akakpo and Ndour, 2013; Boukary et al., 2014; McDermott and Arimi, 2002).

3.1.5 Au Maghreb

3.1.5.1 Au Maroc

a) Brucellose bovine

Au 9ème congrès sur les brucelloses à Oran (1939), Zottner rapportait que la brucellose animale au Maroc est une maladie d'importation et les épizooties observées ont toujours pu être rapportées à la contamination par des animaux importés. Plusieurs foyers de brucellose bovine ont été détectés dans différentes régions entre 1930 et 1938 (Nguyen et al., 1968).

Depuis plusieurs essais de lutte ainsi que plusieurs études ont été menés pour évaluer la prévalence de la brucellose bovine au Maroc, citons :

Une étude menée entre 1966 et 1967 rapporte un taux d'infection individuelle de 11,37% et une prévalence cheptel de 52% et que 37% des cas d'avortements étaient dus à *Brucella* (Nguyen et al., 1968).

Une enquête sérologique fût entreprise pendant l'année 1974, sur le cheptel bovin laitier urbain rapporte que l'infection brucellique se situe autour de Casablanca, Rabat, Salé, Fès et Meknès avec un taux compris entre 10 à 25% ; et qu'elle touche essentiellement les races importées qui ont disséminées la maladie dans le pays (Belkhayat, 1976).

Suite à ces travaux, la brucellose a été considérée comme maladie réputée légalement contagieuse au Maroc en vertu du dahir portant loi n° 1- 75-292 du 19 septembre 1977, à déclaration obligatoire et donnant lieu à l'application obligatoire des mesures de police sanitaire vétérinaire.

Une étude conduite dans la région de Rabat en 1981, révèle un taux d'infection de 17,37% et la brucellose était responsable de 36,66% des avortements (Bekkali, 1981).

Une enquête relative à la situation de la brucellose bovine, à l'Echelle Nationale, a été réalisée en 1988 et a permis de mettre en place un plan national de lutte contre cette maladie . Ce dernier, qui était très ambitieux, n'a pu être exécuté dans sa globalité, du fait de l'apparition d'autres maladies

A partir d'octobre 1995, la Direction de l'Elevage s'est proposée de procéder à une évaluation de la situation de cette maladie, dans la perspective de la mise en place d'une nouvelle stratégie de lutte. Les résultats obtenus, peuvent se résumer comme suit : un taux d'infection de 14,1%, pour les unités pépinières. Pour les élevages non pépinières, un taux de contamination de 6,2% ; et pour les vaches de race locale, la séropositivité a été estimée à 0,25 % (Anonyme, 1998).

Une enquête épidémiologique récente a été réalisée au Maroc, en 2010, ainsi que le bilan des déclarations officielles de la maladie durant les 10 dernières années, ont montré que cette maladie sévit à l'état enzootique dans différentes régions du pays avec des prévalences variables selon les catégories d'élevages, la taille des troupeaux et les races élevées. Concernant l'enquête réalisée en 2010, les résultats globaux ont montré des prévalences sérologiques moyennes de 4,9% et 2,1% respectivement au niveau des élevages et chez les bovins (par la technique EAT) (ONSSA, 2014).
Considérant l'importance de cette maladie, sa lutte a constitué une priorité depuis plusieurs années afin de la contrôler et d'en réduire son incidence dans les élevages. Ainsi, la réglementation en vigueur (arrêté ministériel du 5.11.2001) a défini les grands axes du programme de contrôle et de lutte contre cette maladie comme suit :
dépistage des élevages, marquage et abattage des bovins atteints; désinfection des exploitations infectées; indemnisation des éleveurs; vaccination des bovins (vêles et femelles adultes), lorsque cette mesure est décidée par l'ONSSA; dépistage régulier de la maladie chez les autres animaux jusqu'à assainissement de l'exploitation; mise en place et respect des règles de biosécurité au niveau des élevages.

Aujourd'hui, l'ONSSA (Office Nationale de la sécurité sanitaire des produits alimentaires) déclare 72 cas dans 7 foyers de brucellose bovine au Maroc, durant l'année 2014 (ONSSA, 2014).

b) Les souches de *Brucella* identifiées au Maroc chez les bovins

Plusieurs études menées sur l'identification des souches de *Brucella* prévalentes dans les élevages bovins au Maroc, rapportent l'existence de ***B. abortus*** **bv 3** (biovar prédominant), *B. abortus* bv 3/6 et ***B. abortus*** **bv 1** (Taoudi et al., 1984 ; Verger et al., 1984 ; El Hraiki, 1984).

c) Brucellose des petits ruminants

Pour les caprins, l'infection a été signalée de 1921 à 1936 dans différentes régions suite à une contamination humaine ou à des signes cliniques (Nguyen et al., 1968).
La situation de la brucellose des petits ruminants est restée méconnue jusqu'au début des années 1990, quand la présence de l'infection a été confirmée, d'abord par la sérologie puis par l'isolement et l'identification de ***Brucella melitensis*** **bv 3** (Benhabyles et al., 1992).

En effet, des investigations sérologiques basées sur l'exploitation de sérums provenant de plusieurs régions du Maroc, de 1981 à 1991, ont révélé un taux global d'infection de troupeaux ovins et caprins de 14,28% (Benhabyles et al., 1992). D'autres études ponctuelles menées sur des troupeaux ovins dans un contexte d'avortements ont montré des taux variant entre 1 et 1,8% (Benkirane et al., 1990; El Idrissi Hamzy et al., 1995).

En 1996, l'évolution inquiétante de la situation a retenu l'attention des responsables et il a été décidé d'entreprendre, en collaboration avec la FAO, une enquête séro-épidémiologique dans la région de l'Oriental, la seule qui était jusqu'alors infectée. Cette enquête était destinée à déterminer la prévalence de la maladie dans ces provinces afin de pouvoir définir et mettre en place une stratégie de lutte appropriée. Cette enquête a révélé que 1,6 % des ovins et 4,2% des caprins de cette région étaient infectés, avec un taux global de 2,07% et une prévalence troupeau de 12,1 ± 1,3% (avec E.A.T.). Suite à ces résultats, un programme de lutte était instauré dès 1997; il visait la protection des troupeaux par la vaccination dans les communes où l'infection était établie (El Idrissi, 1996). Simultanément des études sérologiques ont été conduites et ont confirmé l'absence de la brucellose dans le reste du pays (Benkirane, 2006).
Les résultats préliminaires d'un suivi épidémiologique sur trois campagnes agricoles (1997-2000) des foyers d'avortement chez les petits ruminants en élevage extensif dans quatre régions pastorales rapporte un taux d'infection troupeau de 2,3% (El Jai et al., 2003). Une étude menée en 2004 sur la prévalence de la brucellose chez les caprins dans le régions de Chefchaouène et Tétouan n'a rapporté aucun cas de brucellose (Berrada et al., 2004). Les données les plus récentes de l'ONSSA rapportent 1 foyer en 2012 et un foyer en 2013 de brucellose caprine (ONSSA, 2013).

3.1.5.2 En Tunisie

a) Brucellose bovine

En 1953, Renoux et Cordier ont examiné 150 vaches dont 44% étaient infectées. De 1954 à 1958, le pourcentage de séropositivité, à partir des résultats annuels de sérodiagnostic, était de

24,08%. Ce pourcentage a varié par la suite de 1959 à 1978, de 1,57% à 11,78 ; pour diminuer jusqu'à 1,87% de 1979 à 1983.

En 1983, deux études ont été menées : une enquête réalisée par l'Institut Pasteur de Tunis (IPT), dans sept gouvernorats du Nord de la Tunisie, qui rapporte un taux d'infection chez les bovins de 1,88%. Une deuxième étude sérologique réalisée par l'Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie, qui révèle une séroprévalence cheptel de 13,5% et une séroprévalence animale de 3,8%.

D'autres enquêtes sérologiques réalisées dans le cadre de thèse de doctorat vétérinaires de 1980 à 1984, dans cinq régions différentes de la Tunisie, rapportent un taux moyen de 1,9%.

En 1985, un dépistage sérologique a été effectué dans tous les élevages bovins relevant de l'Office des Terres Domaniales, a révélé un taux de 0,75% (Chaabani, 1995).

Depuis 1970, un programme de lutte contre la brucellose bovine est instauré, basé sur la vaccination des jeunes femelles et l'abattage des sujets présentant une sérologie positive.

De 1973 à 1993, la brucellose bovine a régressé selon les déclarations du ministère de l'agriculture de 3 fois. De 1990 à 1994, une incidence annuelle de 8 cas /an a été déclarée, avec une prévalence nationale de 2%. Il faut noter que 90% des foyers déclarés sont localisés au nord du pays. Ceci s'explique par fait que cette maladie sévit là où il y a la plus forte concentration en bovins (Chaabani, 1995). De 2004 à 2009, 38 foyers de brucellose bovine ont été déclarés en Tunisie (voir fig. 3.2) (Benzarti et al., 2011). En 2011, 6 foyers ont été déclarés par l'OIE (WAHID, 2011).

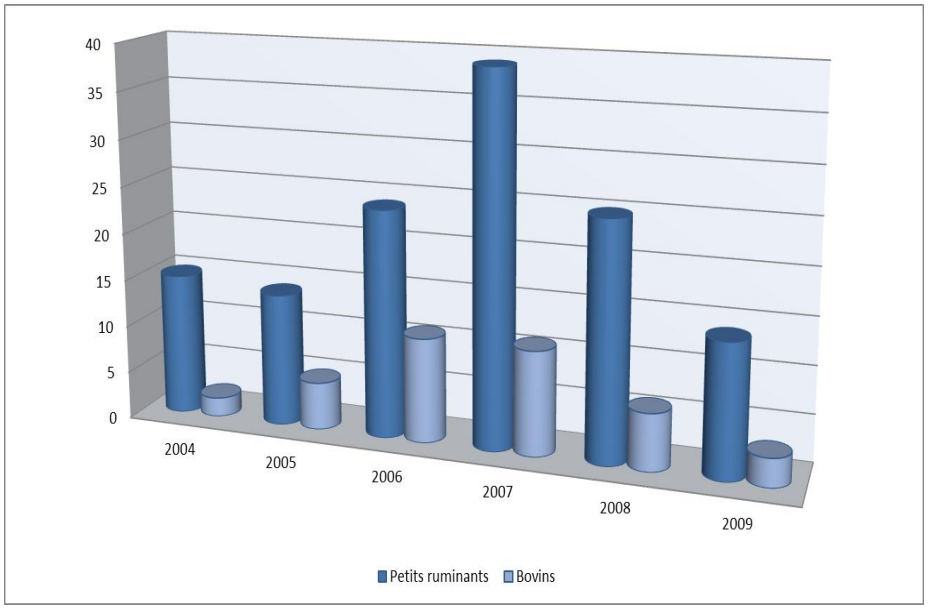


Figure 3.2 : évolution du nombre de foyers de brucellose bovine et de petits ruminants en Tunisie de 2004 à 2009 (Benzarti et al., 2011)

b) Les souches de *Brucella* identifiées en Tunisie chez les bovins

Sur le plan bactériologique, l'espèce isolée chez les bovins en Tunisie est ***Brucella abortus*** (Chaabani, 1995).

c) Brucellose des petits ruminants

L'évolution de l'épidémiologie de la brucellose des petits ruminants en Tunisie, peut être scindée en deux périodes : La première période : avant 1989 et la deuxième période : à partir de 1989.

- **Période avant 1989**

En 1909, Nicolle et Conseil confirmèrent le rôle joué par les chèvres dans la propagation de la maladie, et montrèrent que les chèvres maltaises sont davantage contaminées que les chèvres locales. Ces constations amenèrent les autorités à prohiber l'importation et le transit des chèvres et de viande fraiche provenant de l'Ile de Malte. Ces mesures entrainèrent la diminution du taux d'infection de 1,5% en 1909 à 0,6% en 1916. Mais l'infection des chèvres locales avait commencé à progresser pour atteindre 9,7% en 1922.

En 1953, les travaux de Renoux et Cordier ont révélé un taux d'infection de 44,5% chez les caprins et de 19% chez les ovins.

De 1980 à 1982, 279 sérums caprins on été testés à l'IPT et n'ont révélé aucun sérum positif. Par la suite, nous retrouvons des données à partir d'enquêtes sérologiques menées dans le cadre de thèse de doctorat vétérinaires : chez les caprins, trois enquêtes sérologiques menées entre 1982 et 1986 dans trois régions, révèlent un taux d'infection de 3,1%. Chez les ovins, neuf études menées dans sept régions différentes, de 1980 à 1987, rapportent un taux moyen de 1,78%. A noter qu'avant 1989, aucun programme de lutte n'avait été mis en œuvre contre la brucellose des petits ruminants (Chaabani, 1995).

- **Période à partir de 1989**

En 1989, une épizootie de brucellose a été déclarée chez les petits ruminants dans le sud tunisien. La maladie s'est diffusée rapidement dans les élevages limitrophes et a provoqué une flambée épizootique (Gharbi et al., 2001). De 1991 à 1993, la brucellose des petits ruminants a connu une recrudescence importante et l'incidence déclarée de la maladie a connu une augmentation remarquable, avec un taux d'infection de 6,91% chez les caprins et de 2,09% ± 0,18% chez les ovins. La maladie a été répandue dans presque tout le pays mais les régions de centre-ouest et du sud-ouest ont été les plus touchées (Chaabani, 1995).

Entre 1980 et 2012, plusieurs études menées dans le cadre de thèse de doctorat, dans différentes régions du pays, révèlent des taux d'infection chez les caprins variant de 0 à 61,5% (Ben Malek, 2012 ; Lahmar, 2013). Les études de 2008 à 2012 rapportent que le taux

d'infection des élevages caprins suit un gradient croissant du nord vers le sud, allant de 2,38% au nord à un taux très élevé de 65,78 % au sud (Lahmar, 2013).

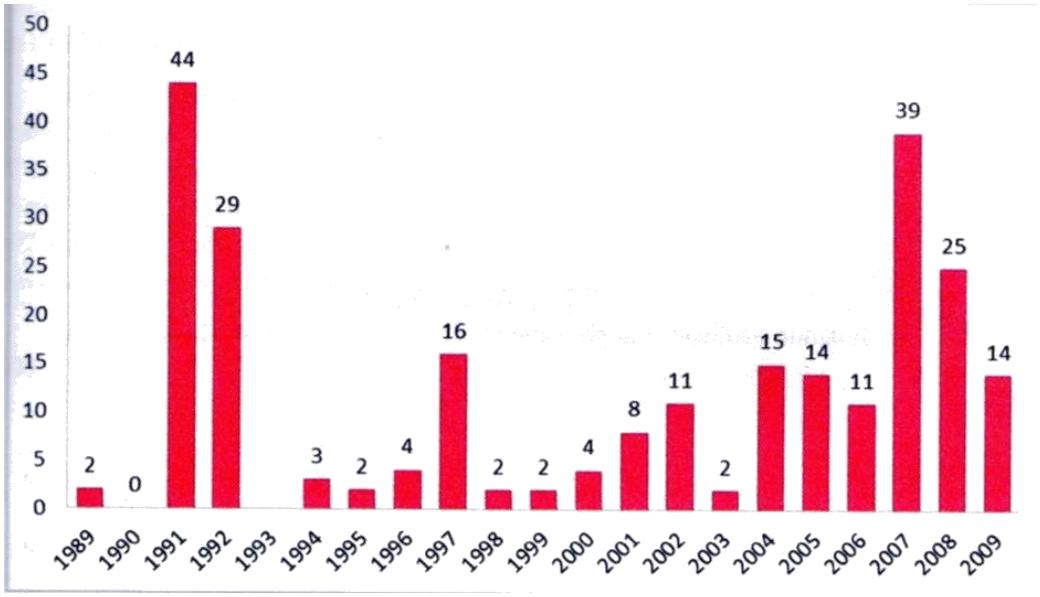


Figure 3.3 : Evolution du nombre de foyers de brucellose ovine et caprine de 1989 à 2009 (Ben Malek, 2012)

3.1.5.3 En Algérie

a) Brucellose bovine

Il fallait attendre quelques années après l'indépendance, pour retrouver la première étude menée sur la brucellose bovine par Benelmouffok en 1969. En effet, pour reconstituer le cheptel bovin, le ministère de l'agriculture importa des bovins de race pure. Ces animaux étaient apparemment indemnes de brucellose à leur arrivée, mais ils étaient malades après un séjour d'un an au maximum. Devant la fréquence des avortements au sein de ces élevages, des sondages furent entrepris. Ils rapportèrent un taux d'infection de 23% au sein du secteur d'Etat. L'infection était étendue principalement au nord du pays (Benelmouffok, 1970).
Suite à cette situation, une ébauche de prophylaxie a été entreprise en 1970. Un essai de lutte contre la brucellose bovine (1970-1976) a été mis en place dans les élevages autogérés de l'Etat. Il était basé sur le dépistage dans les unités où des avortements étaient constatés et abattage des animaux infectés, avec vaccination des vêles de 4 à 7 mois au vaccin B19 aussi bien en milieu sain qu'en milieu contaminé. Cependant, la brucellose bovine persistait et se propageait sans succès apparent (Benaouf et *al.*, 1990). Dans une deuxième étude en 1976, Benelmoffok rapporta le bilan du dépistage sérologique montrant une régression du taux d'infection à 17% en 1970 puis sa stabilisation aux environs de 12% (Benelmouffok, 1979). Compte tenu de ces constations, un programme d'assainissement plus approprié a été adopté au niveau de certaines wilayas (1976-1984). En 1983, au symposium international de la

brucellose à Alger, Benelmouffok et *al.* rapportèrent le bilan du sondage sérologique de la brucellose bovine en Algérie, de 1969 à 1982 (secteur d'Etat). Le taux d'infection qui s'était stabilisé à 12% en 1978, avait régressé pour se situer à 5%. Aucune wilaya n'était indemne de brucellose, même celle où l'élevage bovin était marginal. Ajouté à ceci, le contrôle était irrégulier et jamais total (Benelmouffok et *al*., 1984).

D'autre part, Benaissa et Benaouf rapportèrent une étude faite à Annaba de 1976 à 1982 sur la brucellose bovine dans secteur d'Etat. Ils découvrirent qu'en 1978 près de 10% des animaux importés étaient séropositifs et ce, malgré les contenus des certificats sanitaires qui les accompagnaient (Benaissa & Benaouf, 1984).

A l'Est du pays, l'application des mesures prophylactiques, en particulier dans la wilaya d'Annaba, a permis de diminuer le taux d'infection brucellique qui est passé de 14,1% en 1976 à 1,9% en 1982 (Benaouf et *al.*, 1990).

A l'Ouest, le taux de la brucellose bovine à Tlemcen, en 1969-1970 chez les bovins des domaines autogérés fût de 61,1% puis descendit jusqu'à 1,1% en 1979. Pourtant, une étude menée par Hamza-Cherif rapporta en 1983, un taux d'infection de 10,8% (Hamza-Cherif, 1984).

Suite à l'épidémie de Ghardaïa en 1984, un programme national de lutte contre la brucellose (1984) fût instauré et les 7 laboratoires régionaux vétérinaires fût installés pour le dépistage de la brucellose (Benaouf et *al.*, 1990).Ainsi, une note ministérielle a instauré l'obligation de la prophylaxie de la brucellose bovine. Elle ne concernait toutefois que les exploitations bovines du secteur public, soit moins de 10% du cheptel national (Benaissa & Benaouf, 1984 ; Benaouf et *al.*, 1990). Depuis, plusieurs études ont été menées par les laboratoires vétérinaires régionaux dans différentes wilayas du pays, pour connaître la situation réelle de cette maladie en Algérie :

Dans la région Ouest, Boudilmi et *al.* ont mené une enquête épidémiologique dans 6 wilayas, et sur un échantillon représentant environ 1% du cheptel. Les résultats obtenus ont confirmé l'existence de la brucellose; avec un taux d'infection de 6% dans la population bovine (Boudilmi et *al.*, 1990).

Dans la région Est, l'application des mesures prophylactiques, en particulier dans la wilaya d'Annaba, a permis de diminuer le taux d'infection brucellique. En effet, les résultats du dépistage sérologique de la brucellose bovine rapportent un taux de 11% en 1984, puis de 2,6% en 1985 et de 1,3% en 1986 (Benaouf et al., 1990). En 1987, une étude fût entreprise dans le cadre d'une enquête nationale, réalisée en 2 phases: La 1ère phase: menée par le laboratoire régional d'El Taref, a débuté en avril 1987; elle a concerné les wilayas de: Annaba, El Taref, Guelma, Skikda et Tébessa. Il en ressortait que la brucellose existait chez les animaux du secteur privé dans 5 wilayas avec un taux de 1,47% chez les bovins (Benaouf et al., 1990). La 2ème phase**:** Lancée en 1989 et menée par le laboratoire régional de Constantine, avec un nombre de prélèvements plus élevé (bovins de race locale). Dans cette phase, l'enquête a été étalée à 3 autres wilayas: Constantine, Sétif et Oum El Bouaghi. Il en résultait un taux d'infection variant de 0,5% (Annaba) à 2,94% (Guelma), soit un taux moyen de 1,92%

(Benaouf et al., 1990).Les résultats révélaient un taux de 1,2% dans la wilaya de Sétif, 2,74% à Constantine et 1,58% à Oum El Bouaghi (Mehelmli, & Bendjazia, 1990).

Une autre enquête menée à Constantine et Mila par le laboratoire régional de Constantine, a retrouvé un taux de 12,6% d'élevages positifs au ring-test. À l'issue de ce résultat, des prises de sang ont été réalisées sur les bovins des exploitations positives. Les résultats sérologiques donnent un taux d'infection de 27,7%, avec 31,2% pour Constantine et 7,6% pour Mila. Suite aux renseignements pris auprès des éleveurs, une corrélation positive existe entre le fort pourcentage d'animaux sérologiquement positifs et les avortements, rétentions placentaires et autres symptômes (Boukerrou, 1990).

Une autre enquête séro-épidémiologique, réalisée dans la wilaya de Sétif, donne un taux de 2,35% pour les bovins (Hamdi-Cherif et *al.*, 1990).

Tous ces résultats ont démontré l'étendue et l'importance de l'enzootie au sein du cheptel de tout le pays (voir fig. 3.5)., ce qui a incité la mise en place par le ministère de l'agriculture et du développement rural un autre programme national en 1995 en vigueur jusqu'à aujourd'hui. Le programme national de lutte contre la brucellose (1995) est basé sur la prophylaxie sanitaire par des opérations de dépistage du cheptel et sur des opérations de police sanitaire (Cf. annexe 4).

L'évolution du taux d'infection de la brucellose bovine depuis le début de ce programme montre une amélioration en l'espace de dix ans. Le taux est passé de 1,70% en 1995 à 0,66% en 2004 et 0,72% en 2005 (DSV , 2005).

Depuis le début du programme jusqu'à 2004, le dépistage a touché 848 931 têtes bovines dont 8888 se sont révélées positives. On constate que chaque année une moyenne de 100 000 bovins dépistés, une moyenne de 400 foyers et 800 cas déclarés. Le taux moyen de séropositivité durant cette première décennie de lutte n'excédait pas 0,78% (DSV , 2005).
Mais lors de la deuxième décennie, de 2004 à 2013, le taux moyen de séropositivité est de 0,92%. Nous constatons que le taux d'infection commence à augmenter graduellement, surtout à partir de 2008 (0,95%), pour atteindre un taux de 1,30% en 2013 (voir fig. 3.4). Ceci pourrait s'expliquer par la baisse remarquée (de moitié) du nombre d'animaux dépistés annuellement, à l'échelle nationale. En effet, le nombre d'animaux dépistés passe d'environ 150 000 en 2007, à 85 000 en 2012 (DSV, 2014). Ce qui permet la propagation de la maladie par les animaux infectés non apparents, sans aucun contrôle des mouvements des animaux. Cette baisse de dépistage pourrait s'expliquer car elle coïncide avec la mise en place depuis 2008, du programme de développement de la production nationale de lait cru, dont l'un des objectifs principaux est l'augmentation maximale de la collecte de lait cru (Bulletin info élevage, 2013). Ainsi, pour encourager cette collecte de lait, les éleveurs ne sont plus obligés de présenter un agreement sanitaire (élevage indemne de brucellose/tuberculose), par conséquent ne sont plus contraint de faire un dépistage de leurs animaux.

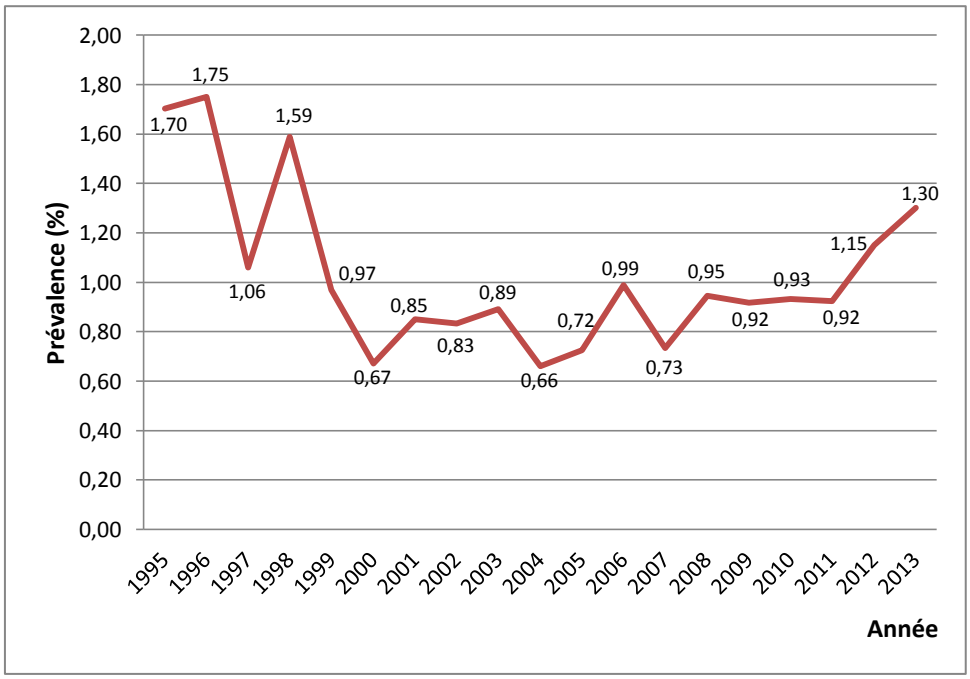


Figure 3.4 : Evolution du taux d'infection national de la brucellose bovine en Algérie de 1995 à 2013 (DSV, 2014)

Durant deux décennies, à savoir depuis le début du programme (1995) jusqu'à 2013, le taux moyen de séropositivité est de 1,03% (DSV, 2014) (voir fig. 3.4).

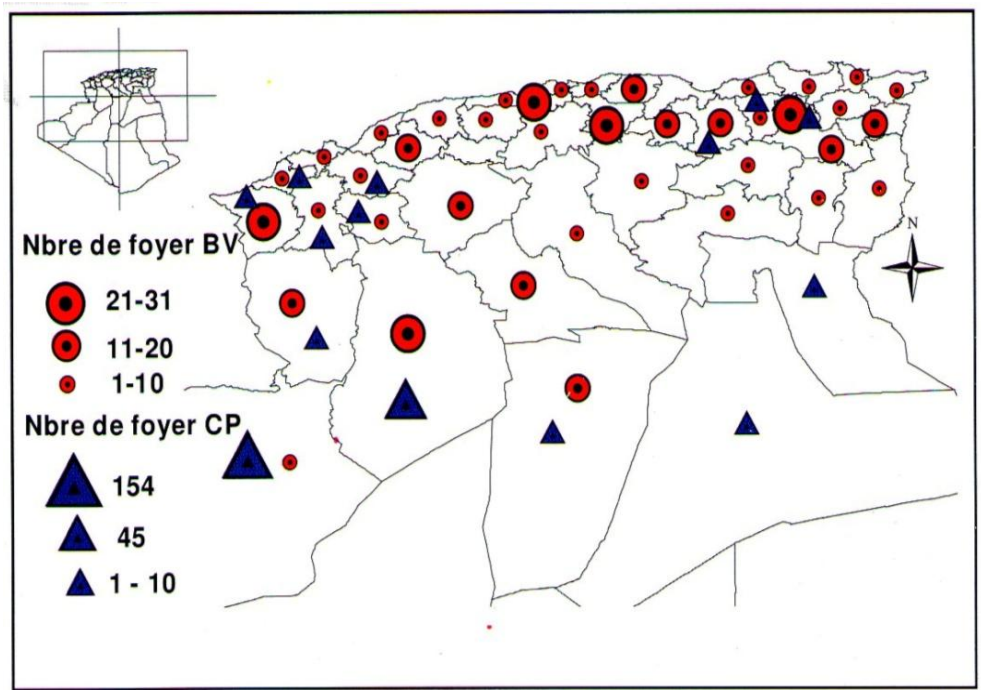


Figure 3.5 : Répartition des foyers de brucellose bovine et caprine en Algérie (année 2010) (DSV, 2010)

b) Les souches de *Brucella* identifiées en Algérie chez les bovins

Sur le plan bactériologique, nous retrouvons une seule étude menée dans la wilaya de Tiaret en 2002-2003, qui rapporte l'identification d'une seule souche de ***B. melitensis*** **bv 3**, isolée dans le lait de vache (Aggad and Boukraa, 2006).

c) Brucellose des petits ruminants

i) Brucellose caprine

Les premières études sur la brucellose animale en Algérie, furent instituées en 1907 sur des élevages caprins par Sergent et collaborateurs à Alger et Oran. Ces études révélèrent l'infection non seulement des caprins mais aussi des autres animaux domestiques, rapportant un taux d'infection caprine de 4% à Alger et de 3% à Oran. Le taux était élevé dans les élevages comprenant des chèvres maltaises (Sergent, 1908a; Sergent and Bories, 1908; Sergent et *al.*, 1908; Wyatt, 2009).
A l'issue de ces travaux, le gouverneur général de l'Algérie pris un arrêté interdisant l'importation de caprins provenant de Malte. Ceci fut les premières mesures prophylactiques prises contre la brucellose, en Algérie. Dès la découverte de la brucellose en Algérie, plusieurs travaux relièrent son origine à l'importation de chèvres maltaises au Nord et de chèvres espagnoles à l'Ouest du pays (Sergent, 1908b).
Depuis, on ne retrouve plus d'étude sur les caprins en Algérie, jusqu'en 1984, lorsqu'une épidémie explosa à Ghardaïa, provoquant 600 cas humains. Une enquête menée sur les caprins de la région, révéla un taux d'infection de 8,2% à l'origine de cette épidémie (Cherif et al., 1986). Ce qui a incité le ministère de l'agriculture a initié un programme national de lutte contre la brucellose caprine en 1984. Ainsi, plusieurs études ont été menées par les laboratoires vétérinaires régionaux dans différentes wilayas du pays, pour connaître la situation dans les élevages caprins en Algérie :

A l'Ouest, Boudilmi et *al.* rapportent un taux d'infection de 2% dans les populations caprines de 6 wilayas de l'ouest algérien (Boudilmi et *al.*, 1990).

A l'Est, l'enquête de 1987 qui a concerné 5 wilayas n'a révélé aucun sérum positif chez les caprins. Dans la 2ème phase, en 1989, aucun cas positif n'a été enregistré chez les caprins, sauf un taux de 0,31 dans la wilaya de Sétif. Cela ne permet pas d'affirmer que la brucellose caprine est inexistante dans cette région (Benaouf et *al.*, 1990).

Dans la région sud, suite à l'épidémie de 1984 à Ghardaïa, un important programme de dépistage de la brucellose a été initié par le ministère de l'agriculture concernant 3000 caprins, révélant un taux d'infection de 20%. Après l'instauration d'importantes mesures de prophylaxie au sein des populations, une campagne menée en 1987 à Ghardaïa, rapporte un taux d'infection de 6%. Une autre campagne en 1989 détecte un taux de 1,39%. La même année, une autre campagne a concerné toutes les communes de la vallée donnant un taux de 2,28%. Il a été révélé l'existence d'au moins 1 cas positif par commune (Cherif, 1990).

Comme pour les bovins, en 1995, le programme national pluriannuel de lutte contre la brucellose concernait également les caprins (Cf. annexe 3).

Durant une décennie, de 1995 à 2005, l'évolution du taux d'infection est resté relativement important et stable; soit un taux d'infection moyen de 4,74% (voir fig. 3.6). Durant cette période 600782 têtes ont été dépistées (ce qui ne représente que 1% de l'effectif caprin national) et 27893 têtes caprines se sont révélées positives. A noter que la source principale de la contamination humaine en Algérie, reste le caprin (DSV, 2005). Le problème de la conduite de prophylaxie sanitaire chez le caprin dans la pratique reste difficile vu le mode d'élevage souvent mixte (ovin-caprin), semi intensif à extensif.

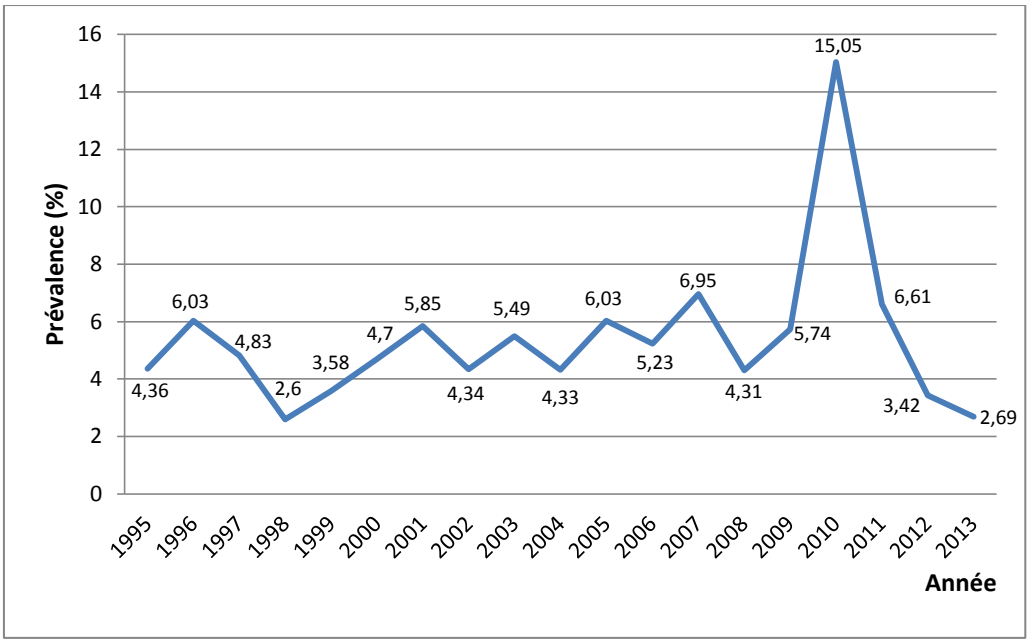


Figure 3.6 : Evolution du taux d'infection national de la brucellose caprine en Algérie de 1995 à 2013 (DSV, 2014)

Afin d'évaluer la fréquence de la brucellose des petits ruminants, une enquête par sondage sérologique sur un échantillon représentatif des troupeaux caprins, ovins et mixtes a été réalisée durant l'année 2000-2001 par la DSV, notamment à Batna, Biskra, Khenchela, M'Sila, Adrar, Djelfa, Ghardaïa, Laghouat, El Bayadh, Nâama, Saïda, Tiaret, Tlemcen et El Oued. Il en ressort une prévalence de 9,58% chez les caprins et 3,82% pour les élevages mixtes. La prévalence des cheptels caprins est largement supérieure aux cheptels ovins et mixtes. Quatre wilayas se distinguent par leur forte prévalence: Biskra, Khenchela, Djelfa et Laghouat. La répartition géographique de la prévalence de la brucellose des petits ruminants permet de voir une sous région à forte prévalence (supérieure à 5%) qui s'étend de l'Est vers le Centre du pays. La région Est est la plus touchée suivie de la région Centre puis de l'Ouest (voir fig. 3.7 et 3.8). Concernant les cheptels mixtes, la prévalence est relativement égale dans les trois régions. Il est à noter que la prévalence au sud reste négligeable pour les trois types de cheptels (Benbernou et *al.*, 2004 ; DSV, 2002).

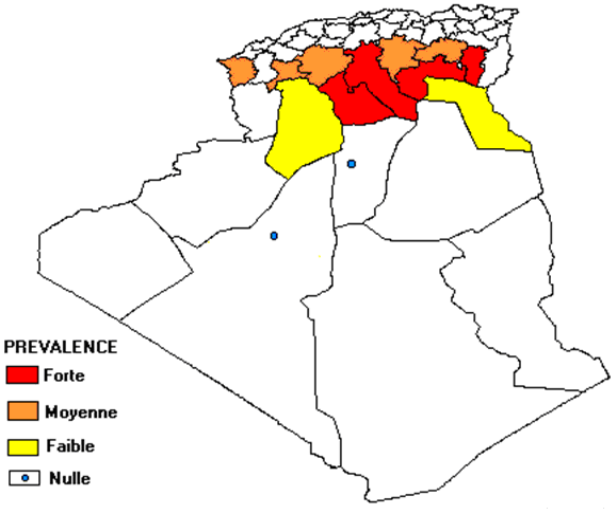


Figure 3.7: répartition géographique de la prévalence cheptel de la brucellose des petits ruminants (Benbernou et *al.*, 2004)

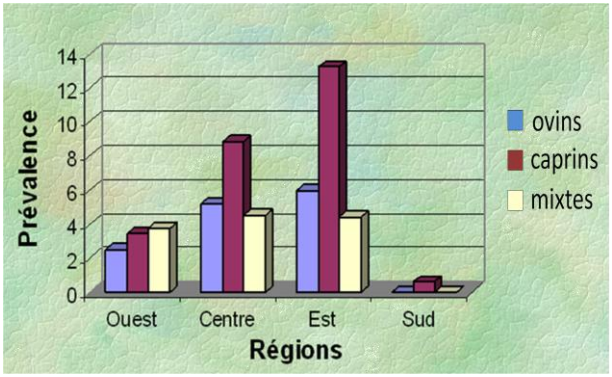


Figure 3.8: prévalence de la brucellose par type de cheptel et par région (Benbernou et *al.*, 2004)

Face à cette situation, un nouvel plan de lutte a été mis en place par les services vétérinaires, à partir de 2006, basé sur une prophylaxie médicale avec une vaccination de masse des petits ruminants, par le vaccin Rev 1, dans les wilayas à forte prévalence notamment : Tébessa, Biskra, M'sila, Laghouat, Khenchela, Djelfa et Ghardaïa (DSV, 2007). En 2008, six autres wilayas sont concernées : Saida, El Bayadh, Tiaret, Batna, Oum El Bouaghi et Médéa (DSV, 2008). En 2010, cette compagne de vaccination a été élargie à 19 wilayas, en ajoutant : Tlemcen, Nâama, Sidi Bel Abbés, El Oued, Souk Ahras, Tissemsilt (DSV, 2010). En 2011, trois autres wilayas ont été ajoutées : Béchar, Relizane et Ain Defla (DSV, 2011) (voir fig. 3.10).

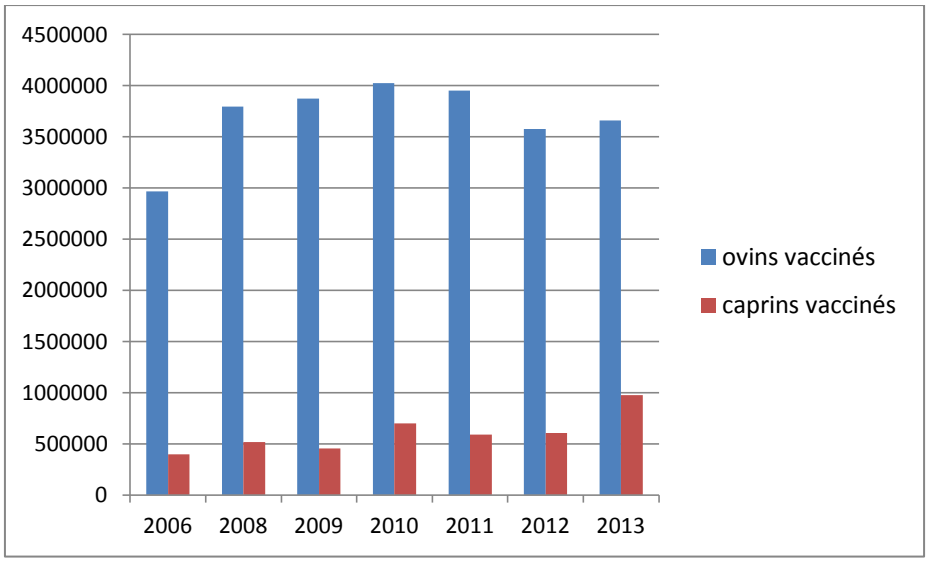


Figure 3.9 : Evolution du nombre de caprins et ovins vaccinés de 2006 à 2013 (DSV, 2014).

Simultanément, dans le reste des wilayas non concernées par la vaccination, la prophylaxie sanitaire (dépistage/abattage) continue d'être appliquée aux caprins. Ainsi, de 2006 à 2013, 172449 têtes ont été dépistées et 10462 têtes caprines se sont révélées positives, avec un taux d'infection moyen de 6,25% (de 1995 à 2013, un taux moyen de 5,38%). On note un pic de 15% enregistré en 2010 (voir fig. 3.9), et on constate que 78,5% des foyers déclarés cette année ont été enregistrés dans les wilayas de Béchar et El Bayadh (DSV, 2010).

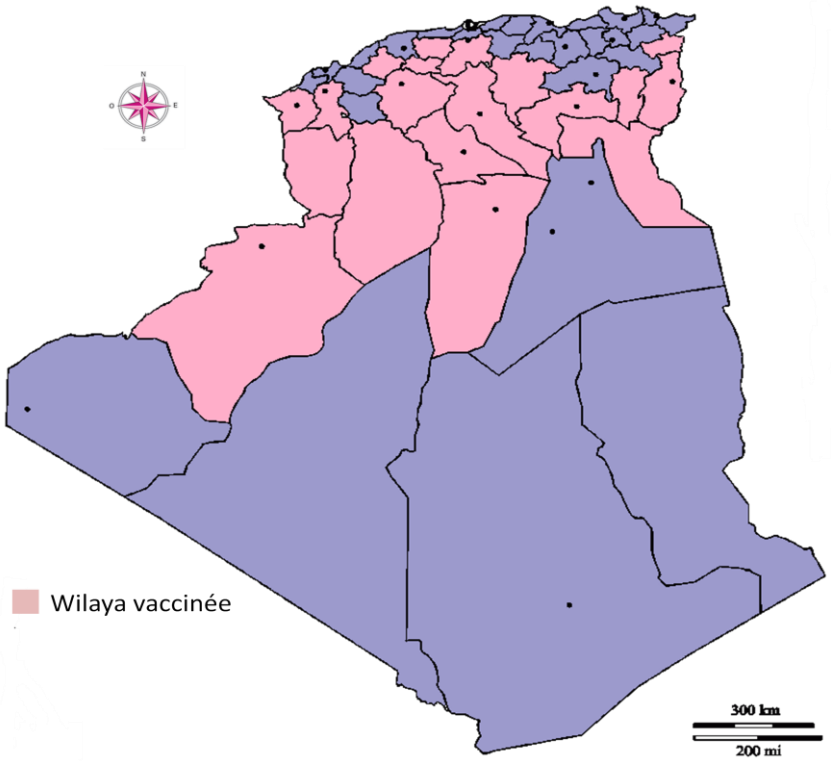


Figure 3.10 : Distribution des wilayas concernées par la vaccination en Algérie en 2011 (Figure personnelle)

ii) Brucellose ovine

On ne retrouve d'étude menée sur la brucellose ovine en Algérie, qu'à partir de la fin des années 80, lors de l'installation des laboratoires régionaux vétérinaires.

A l'Ouest, l'étude réalisée par Boudilmi et *al.* sur 6 wilayas, rapporte un taux d'infection dans la population ovine de 1,74% (Boudilmi et *al.*, 1990).

A l'Est, l'étude réalisée en deux phases rapporte une prévalence de 0,29% lors de la première phase en 1987. Lors de la deuxième phase en 1989, aucun sérum ovin n'était positif, sauf à Oum El Bouaghi avec un taux de 0,15% (Benaouf et *al.*, 1990). Une autre enquête séro-épidémiologique réalisée dans la wilaya de Sétif, donne un taux de 3,08% pour les ovins (Hamdi-Cherif et *al.*, 1990).

L'espèce ovine était également concernée par le programme national de lutte contre la brucellose instauré en 1995 (Cf. annexe). Pourtant sur terrain, cette espèce reste négligée, aucun ou très peu de dépistage a été réalisé. L'épidémiologie et la prévalence de la brucellose ovine reste mal connue. Lors de l'étude menée par la DSV, en 2000-2001 sur 14 wilayas, on rapporte un taux d'infection de 3,63% chez les ovins (Benbernou et *al.*, 2004 ; DSV, 2002).

Cependant, le programme de vaccination lancé en 2006 est appliqué sur les ovins des wilayas concernées (voir fig. 3.10).

La figure 3.11 résume le nombre de foyers de brucellose ovine déclarés de 1998 à 2010, mais cela ne reflète pas la situation réelle, car ce sont des foyers détectés suite à des dépistages occasionnels.

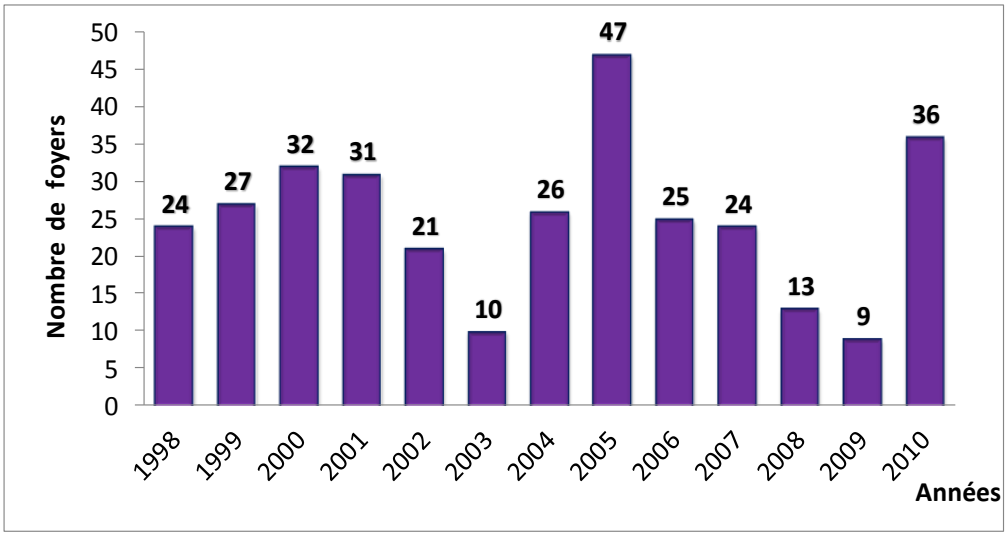


Figure 3.11 : Nombre de foyers ovins déclarés de 1998 à 2010 (DSV, 2011)

iii) Les souches de *Brucella* identifiées en Algérie chez les petits ruminants

Sur le plan bactériologique, nous retrouvons une seule étude conduite par Boudilmi et al. en 1990, au laboratoire régional de Tlemcen, qui a identifié quelques souches d'origine caprine et ovine à ***Brucella melitensis*** **biovar 3** (Boudilmi et *al.*, 1990).

3.2 Distribution de la brucellose humaine dans le monde

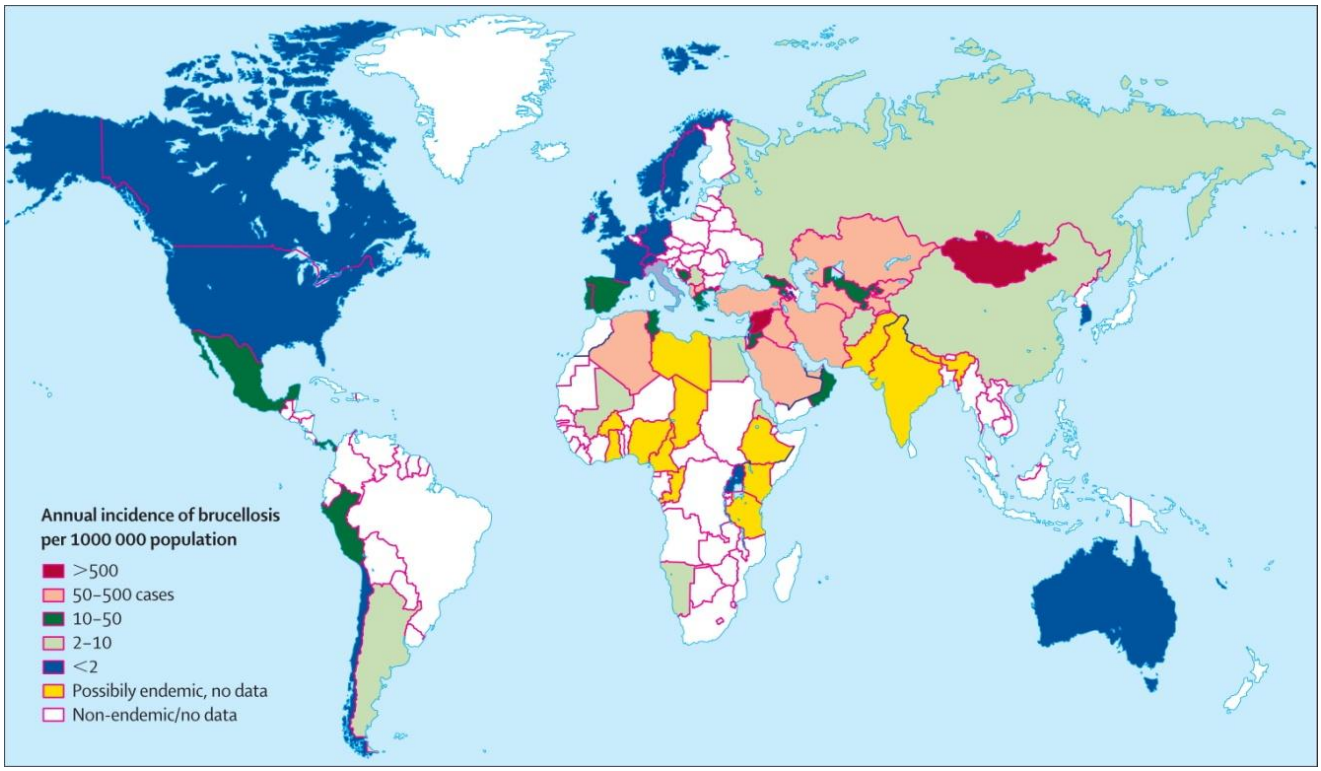


Figure 3.12 : Distribution de la brucellose humaine dans le monde (Pappas et *al*., 2006)

La brucellose humaine reste la plus fréquente maladie zoonotique dans le monde entier avec plus de 500 000 nouveaux cas par an, est associée à une invalidité résiduelle importante, et est une cause importante de morbidité associée aux voyages. L'épidémiologie globale de la maladie a considérablement évolué cours de la dernière décennie (Pappas et *al.*, 2006).

La distribution géographique de la brucellose change constamment, avec de nouveaux foyers émergeants et ré-émergeants. L'épidémiologie de la brucellose humaine a drastiquement changé par rapport à quelques années à cause des variations sanitaires, socioéconomiques et politiques, associées l'augmentation des échanges internationales. De nouveaux foyers de brucellose humaine ont émergés, particulièrement en Asie centrale tandis que la situation dans certains pays du Moyen Orient s'est rapidement détériorée (Seleem et *al.*, 2010).

La prévalence de l'infection dans les réservoirs animaux conditionne sa fréquence chez l'homme. *B. melitensis* et *B. abortus* sont les espèces le plus souvent en cause en pathologie humaine. Les infections à *B. abortus* et *B. suis* touchent essentiellement les catégories professionnelles à risque ; la brucellose à *B. melitensis* est observée plus fréquemment dans l'ensemble de la population.
Les cas de brucellose humaine sont les plus nombreux dans les pays où l'incidence de l'infection à *B. melitensis* chez les caprins et/ou les ovins est élevée. *B. melitensis* étant responsable des infections les plus graves.

La brucellose humaine demeure endémique dans certains pays, les pays d'Amérique latine où le plus grand nombre de cas ont été enregistrés sont : l'Argentine, le Mexique et Pérou. Ceci est également vrai dans les pays méditerranéens, le Moyen Orient, l'Asie de l'Ouest, et dans certaines régions d'Afrique, l'Iran, la Russie, la Mongolie, l'Arabie Saoudite et la Turquie. En Europe, la brucellose demeure endémique dans certains pays tels que la Grèce, le Portugal, l'Espagne ou l'Italie (Acha and Szyfres, 2005; Maurin, 2005).

Bien que dans la plupart des pays, la brucellose est une maladie à déclaration obligatoire à l'échelle nationale, elle reste sous estimée et les chiffres officielles déclarés ne représentent qu'une fraction de l'incidence réelle de la maladie. Ainsi l'incidence réelle de la brucellose humaine est inconnue et le taux d'infection estimé de la maladie varie considérablement, allant de <0,03 à > 160 par 100 000 habitants (Seleem et al., 2010)

Les programmes de contrôle et d'éradication de la brucellose bovine réduisent de façon sensible l'incidence de la maladies chez l'homme (Acha and Szyfres, 2005).
L'infection des bovins par *B. melitensis* a émergé comme un sérieux problème pour la santé publique dans certains pays du sud de l'Europe et en Israël, résultat de la consommation de lait non pasteurisé, depuis que *B. melitensis* est capable de coloniser la mamelle des bovins. En outre, dans certains pays d'Amérique du Sud, les bovins sont maintenant considérées comme une source plus importante de *B. suis* biovar 1 que les porcs, à l'origine d'infection humaine, car *B. suis* biovar 1 est capable de coloniser la mamelle de bovin comme *B. melitensis* (Godfroid et al., 2011).

Tableau 3.2: incidence mondiale de la brucellose humaine (Pappas et *al*., 2006)

Pays	**Incidence (cas annuel par million de population)**
Europe	
Albanie	63·6
Bosnie and Herzégovine	20·8
Danemark	0·7
France	0·5
Macédoine	148
Géorgie	27·6
Allemagne	0·3
Grèce	20·9
Ireland	1·3
Italie	9
Pays Bas	0·5
Norvège	0·7

Pays	Incidence (cas annuel par million de population)
Portugal	13·9
Russie	4·1
Serbie et Monténégro	8·4
Espagne	15·1
Suède	0·3
Suisse	1·5
Royaume uni	0·3
Afrique	
Algérie	84·3
Cameroun	Endémique, pas de données spécifiques disponibles
Egypte	2·95
Érythrée	5·48
Ethiopie	Endémique, pas de données spécifiques disponibles
Mali	2
Namibie	4·9
Tunisie	35·4
Uganda	0·9
Amérique du Nord	
Canada	0·09
USA	0·4
Mexique	28·7
Amérique Centrale et Sud	
Argentine	8·4
Chili	0·6
Colombie	1·85
Guatemala	15·7
Panama	10·1
Pérou	34·9
Asie	
Afghanistan	3·8
Arménie	31·3
Azerbaïdjan	52·6
Chine	8
Inde	Pas de données disponibles, endémique possible

Pays	Incidence (cas annuel par million de population)
Iraq	278·4
Iran	238·6
Israël	9·2
Jordanie	23·4
Kazakhstan	115·8
Corée du Sud	1
Kuwait	33·9
Kyrgyzstan	362·2
Liban	49·5
Mongolie	605·9
Oman	35·6
Pakistan	Pas de données disponibles, endémique possible
Arabie Saoudite	214·4
Syrie	1603·4
Tadjikistan	211·9
Turquie	262·2
Turkménistan	51·5
Émirats Arabe Unies	41
Ouzbékistan	18
Océanie	
Australie	0·9

3.2.1 En Amérique

Aux **Etats-Unis**, l'image actuelle de la brucellose est représenté par une maladie causée par *B. melitensis,* affectant la population hispanique, localisée dans les zones voisines du Mexique (Godfroid et *al.*, 2011; Pappas et *al*., 2006).

L'**Amérique du Sud** était traditionnellement considéré comme une zone endémique de la brucellose humaine, *B. melitensis* étant répandue au Pérou et à l'ouest de l'Argentine, et *B. abortus* dans l'est de l'Argentine et dans d'autres pays d'Amérique du Sud. Les données de l'OIE rapportent que la brucellose est toujours importante au Pérou et en Argentine. Il n'y a pas de données disponibles pour le Brésil. Actuellement, à l'exception du Pérou et de l'Argentine, l'Amérique du Sud devrait être exclue des zones fortement endémiques au monde de brucellose humaine (Pappas et *al.*, 2006).

3.2.2 En Australie

Un nombre limité de cas de brucellose humaine sont signalés chaque année (Pappas et *al*., 2006).

3.2.3 En Asie

Le **Moyen-Orient** a toujours été considéré comme une zone endémique. En effet, cinq des dix pays ayant la plus forte incidence de la brucellose humaine sont dans cette région. La Syrie a l'incidence annuelle la plus élevée dans le monde, atteignant un chiffre alarmant de 1603 cas par million par année selon les données de l'OIE. La Turquie, l'Iran, l'Iraq, l'Afghanistan, Oman, l'Arabie Saoudite, l'union des Émirats Arabes, le Kuwait, la Jordanie, la Palestine et le Liban déclarent de nombreux cas humains chaque année (voir tableau 3.2) (Pappas et *al*., 2006).

Sept républiques de **l'ancienne Union soviétique** sont inclus dans les 25 pays ayant la plus forte incidence de la maladie dans le monde, tandis que dans un autre pays de cette région, la Mongolie, est classé deuxième. La situation en Asie centrale et occidentale est dramatique : au Kirghizistan, le contrôle de la brucellose est devenue une priorité nationale, prévalence était déjà extrêmement forte peut effectivement être triplée. Au Tadjikistan, Kazakhstan et en Mongolie, les cas annuels rapportés augmentent rapidement. Les données de l'OIE montrent une incidence constante pour l'Arménie, la Géorgie, l'Ouzbékistan et le Turkménistan, et un déclin à l'Azerbaïdjan. Ces pays ont émergé comme le foyer le plus important de la brucellose humaine dans le monde entier au cours des dernières années, et apparemment incontrôlable, l'incidence sans cesse croissante, pose un problème grave de santé publique (Pappas et *al*., 2006).

En **Chine**, durant les 15 dernières années, la prévalence est plus élevée dans les provinces centrales de l'Est. *B. melitensis* est l'espèce la plus fréquente, bien que *B. abortus* et *B. suis* prévalent dans certaines provinces.

Selon les données de l'OIE, un nombre croissant de cas humains a été enregistré au cours de 2003 à 2004 en **Corée du Sud**.

La maladie est endémique en **Inde**, la littérature rapporte de nombreux cas dans des zones isolées, et une prévalence reconnue de la brucellose animale, mais les données officielles de l'incidence de la maladie humaine font défaut.

La maladie animale existe aussi au **Pakistan**, mais il n'existe aucune donnée sur l'incidence de la maladie humaine (Pappas et *al*., 2006).

3.2.4 En Europe

Le statut indemne de brucellose a été accordé par l'Union européenne (UE) à la Suède, le Danemark, la Finlande, l'Allemagne, le Royaume-Uni (sauf Irlande du Nord), Autriche, Pays-

Bas, la Belgique et Luxembourg, Norvège et la Suisse. La plupart de ces pays déclarent un petit nombre de cas chaque année, principalement des cas importés de zones endémiques (Pappas et *al*., 2006).

En 2008, un total de 619 cas de brucellose humaine confirmée ont été signalés dans l'UE (0,1 cas pour 100 000 habitants). L'incidence la plus élevée a été enregistrée dans les Etats membres non officiellement indemne de brucellose bovine et ovine/caprine (Grèce, Italie, Portugal et Espagne) (Godfroid et *al.*, 2011).

En 2010, le taux de notification des brucelloses humaines au niveau de l'UE était de 0,07 par 100.000 habitants. On a observé une baisse importante durant les cinq dernières années. La Grèce, le Portugal et l'Espagne représentent 78% des cas rapportés au sein de l'UE (ISP WIV, 2014).

En **Belgique**, quelques cas humains (4 à 5 cas) sont rapportés annuellement. Depuis 1997, année durant laquelle le dernier cas "autochtone" (*B. abortus* biovar 3) a été notifié, tous les cas rapportés étaient des cas importés (personnes ayant voyagé en zones endémiques). Cependant, en 2012, suite à la survenue de foyers de brucellose bovine, un cas ayant un lien avec ces foyers a été notifié. Un deuxième cas lié à la pratique de la chasse a également été déclaré sans que le sérotype n'ait pu être identifié ; aucun produit de chasse suspect n'a révélé la présence de *Brucella*. 4 cas d'infections à *B. melitensis* ont été identifiés en 2012 (0,05 par 100.000 hab.) (ISP WIV, 2014).

Le bassin méditerranéen est une région endémique connue de la brucellose humaine. La maladie a été décrite initialement à **Malte**, où des cas sporadiques sont notés aujourd'hui (Pappas et *al*., 2006).

En **France**, l'incidence de cette maladie est inférieure à 0,1/100 000 habitants, soit moins de 50 cas déclarés annuellement. Une majorité des cas de brucellose humaine diagnostiqués actuellement en France sont importés, notamment du Portugal, d'Espagne, du Maghreb ou de Turquie. De rares cas autochtones sont soit des cas d'infection au laboratoire ou en raison d'une rechute des mois ou des années après l'échec de la thérapie ou à une réactivation d'une infection latente initiale.
Il s'agit de façon prédominante d'infections à *B. melitensis* biovars 1 (prédominant dans le Nord) et 3, et plus rarement à *B. abortus* biovars 3 et 4 (ce dernier étant cantonné au Massif central). L'espèce *B. suis* est exceptionnellement isolée depuis l'industrialisation des élevages porcins (Maurin, 2005).
En 2012, une épidémie due à *B. melitensis* biovar 3 de la brucellose bovine s'est déclarée dans un troupeau laitier qui produit du fromage de lait cru dans les Alpes françaises et a été soupçonné d'être la source d'un cas humain autochtone inexpliquée préalablement diagnostiqué en 2012 (Mick et *al.*, 2014).

Bien que d'énormes progrès aient été accomplis dans la réduction de la maladie humaine en **Espagne**, le pays a encore un des taux annuel les plus élevé en Europe. Une baisse importante du nombre annuel de cas est notée.

Le **Portugal** a réalisé des progrès par une réduction prononcée des cas de brucellose humaine. La progression est due à un meilleur contrôle dans certains districts endémiques du nord et du centre. Toutefois, la situation n'est pas améliorée dans le sud.

En **Italie**, une baisse régulière du nombre de cas annuels a été observée au cours des 30 dernières années. La majorité des cas ont été rapportés au sud. Aucune des régions septentrionales et centrales n'a rapporté plus de dix cas en 2003.

La **Grèce** reste dans la liste des 25 pays ayant la plus forte incidence dans le monde. Cependant, l'incidence annuelle diminue progressivement. Mais les chiffres seraient sous estimés vu un manque de déclaration dans certaines régions.

Les zones endémiques du Portugal de la Grèce et de l'Italie sont typiquement les zones les plus pauvres de l'UE. La Macédoine et l'Albanie ont l'incidence la plus élevée de la maladie en Europe. La brucellose n'est pas endémique en Europe de l'Est, principalement en Pologne (Pappas et *al*., 2006).

3.2.5 En Afrique

En 2007, l'OIE déclare 11 cas de brucellose humaine en Afrique subsaharienne (ASS). Bien que la brucellose humaine ait été relativement peu étudiée en ASS, l'OMS (2006), considère que plus qu'ailleurs, cette maladie représente une cause importante de morbidité, d'incapacité de travail et de réduction d'activité dans cette partie du monde. Cependant, la prévalence de la maladie humaine est très peu connu en ASS. De manière générale, la brucellose humaine est sous-diagnostiquée en ASS, sans doute en raison de son tableau clinique qui peut être confondu à celui d'autres maladies fébriles. Tout comme chez les animaux, la maladie a été diagnostiquée chez l'homme dans presque tous les endroits où des enquêtes ont été effectuées (Boukary et *al*., 2014).

3.2.6 Au Maghreb

3.2.6.1 Au Maroc

Le premier cas de brucellose humaine a été signalé à El-Jadida en 1916. Durant la période de 1916 à 1938, 63 cas humains ont été diagnostiqués. Ce qui a induit la promulgation de l'arrêté Viziriel du 21-6-1924 complété et modifié par les Arrêtés du 17-8-1936 et du 17-3- 1952 qui constituent les bases de la lutte contre la brucellose au Maroc (Nguyen et al., 1968).
Au cours de la décennie 1981-1991, aucun cas de brucellose humaine n'a été déclaré, cependant quelques rares observations sont rapportées par les services cliniques (Benhabyles et *al*., 1992).
Une étude sérologique réalisée sur la population rurale, en 1999, a rapporté une séroprévalence globale de 1,5 % (IC 95% 1 - 2,3 %). L'étendue des séroprévalences au niveau des 11 régions étudiées oscille entre 0 et 3,3% (Belahcen et *al*., 2002).

Ces dernières années, très peu de cas humains sont déclarés, de 0 à 5 cas par an ont été enregistrés entre 2002 et 2006 (Bulletins épidémiologiques, 2002 à 2008). L'OIE déclare 16 cas humains en 2011 (WAHID, 2011).

3.2.6.2 En Tunisie

Depuis 1878, des descriptions cliniques de la fièvre de Malte ont été rapportées, cependant la maladie ne fut identifiée en Tunisie, qu'en 1904 par Charles Nicolle. Là aussi, l'évolution de l'épidémiologie de la brucellose humaine en Tunisie, peut être scindée en deux périodes : La première période : avant 1989 et la deuxième période : à partir de 1989.

- **Période avant 1989**

En Tunisie, la recherche de séropositivité brucellique chez l'Homme a été régulièrement effectuée chez les sujets fébriles depuis 1908 à l'IPT: le taux d'infection était de 23,52%, en 1908, a atteint 31,5% en 1911, pour diminuer à 13,41% en 1915. Cette diminution semble en rapport avec les mesures prises à l'encontre de l'importation des chèvres maltaises. Le taux augmente à 22,75% en 1921, puis les taux se sont maintenus autour de 10% jusqu'en 1932 pour chuter jusqu'à 0,1% en 1941 et à 0,03% en 1944. A la fin des années 40, une légère augmentation est observée avec un pic en 1950 de 5,38%. A partir de cette date, les taux d'infection se sont maintenus entre 1 à 2%.
De 1979 à 1983, l'IPT a mené une enquête chez les sujets ne présentant pas de fièvre, révélant un taux de 0,25%. De 1980 à 1988, le ministère de la santé publique déclare une incidence annuelle moyenne de 4 à 5 cas /an, totalisant 45 cas enregistrés durant cette période (Chaabani, 1995).

- **Les souches de *Brucella* identifiées chez l'Homme en Tunisie**

Les souches les plus fréquemment isolées depuis 1961 à l'IPT, appartiennent à l'espèce ***B. abortus***, celles appartenant à l'espèce ***B. melitensis*** sont devenues rares. Cependant, entre 1971 et 1981, l'espèce isolée chez tous les patients brucelliques du service des maladies infectieuses de la Rabta sont identifiées à ***B. melitensis*** (Chaabani, 1995).

- **Période à partir de 1989**

Suite à l'explosion de l'épizootie de brucellose chez les petits ruminants et vue les habitudes alimentaires de la population, la population humaine a été victime de cette maladie. En effet, la brucellose humaine à évolué d'une maladie à aspect sporadique (en 1988), à une maladie à aspect endémique (en 1989 et 1990), puis à une maladie à aspect épidémique (de 1991 à 1994). Son incidence a augmenté de 14 fois entre 1988 et 1989 et par plus de 15 fois entre 1990 et 1992. Le taux annuel est passé de 0,066 (entre 1980-88) à 5,5 cas /100 000 habitants/an (entre 1989-93). Cependant, on note une tendance à la diminution en 1994 (Chaabani, 1995).

L'épidémie de 1991-1992 totalise plus de 500 cas dans les régions du Sud-ouest (Chakroun and Bouzouaia, 2007). La répartition géographique de la brucellose humaine en Tunisie montre deux grandes zones : l'une très fortement touchée au centre-ouest et sud-ouest, qui détient 95% des cas. L'autre qui regroupe les zones restantes du pays qui sont très peu touchées, représentant 5% des cas (Chaabani, 1995). Depuis, l'endémicité de la maladie persiste dans ces régions avec une incidence de l'ordre de 2 à 3,5 pour 100000 habitants. Le nombre des cas déclarés varie entre 128 en 2003, 354 en 2004 et 284 en 2005, 80% des cas sont déclarés dans les gouvernorats de Gafsa, Kasserine, Tozeur et Kébili. Depuis 2005, une nouvelle recrudescence des cas de brucellose a été notée dans le Grand Tunis, le nord et le centre du pays (Zribi et al., 2009). En 2006, la notification de 460 cas et surtout la survenue d'une épidémie dans la région du grand Tunis (87 cas) a été observée (Chakroun and Bouzouaia, 2007). Suivit d'un autre pic de 514 cas (5,02 cas/ 100000 hab.) en 2007, qui diminue à 120 cas (1,14 cas / 100000 hab.) en 2009, pour augmenter de nouveau en 2010 et 2011 avec 368 cas (3,48 cas/100000 hab.) et 342 cas (3,42 cas/100000 hab.) respectivement (voir fig. 3.13) (Ben Malek, 2012). L'incidence moyenne est de 320,5 cas enregistrés entre 2001 et 2008 (Benzarti et *al*., 2011).

De 2000 à 2010, la répartition des moyennes de cas de brucellose humaine est variable d'une région à l'autre, on note la moyenne la plus élevée dans le centre ouest avec 20,11 cas /100000 hab. et la plus faible au centre est avec 0,15 cas /100000 hab. (Lahmar, 2013).

L'étude de l'épidémiologie des deux brucelloses humaine et des petits ruminants a montré une corrélation au niveau du biovar responsable : ***B. melitensis bv 3***, et au niveau de l'évolution dans le temps (recrudescence saisonnière et mensuelle en rapport avec la saison de chevrotage : une étude réalisée sur une période de 23 ans (de 1986 jusqu'au décembre 2008) rapporte 75 % des cas en période estivo-automnale) ; et dans l'espace (fréquente dans les mêmes régions) (Benzarti et *al*., 2011 ; Chaabani, 1995).

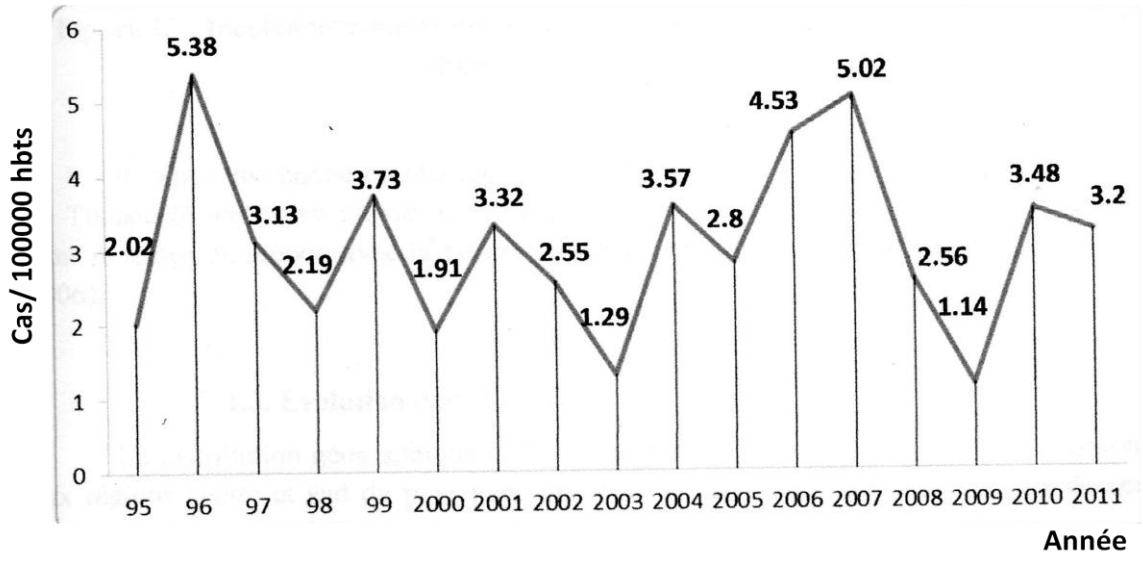
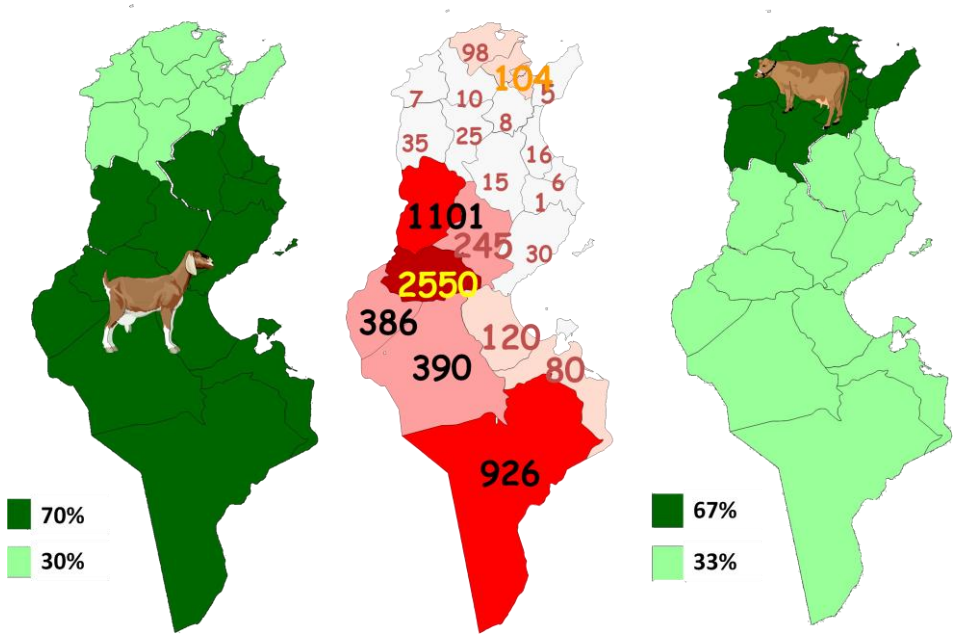


Figure 3.13 : évolution du taux d'incidence de la brucellose humaine en Tunisie entre 1995 et 2011 (Ben Malek, 2012)

L'épidémiologie de la brucellose humaine montre que la maladie touche principalement les sujets de sexe masculin (sex-ratio:1,45), à l'âge adulte (de 20 à 59 ans représentent 65% des cas déclarés) et que la catégorie professionnelle la plus touchée serait les agriculteurs-éleveurs. Cette maladie touche plus les populations rurales que citadines ; en faveur d'une contamination humaine par voie directe durant les premières année de l'évolution de la maladie, par la suite la consommation de lait cru et ses dérivés aurait constitué un bon facteur d'amplification de cette zoonose (Chakroun and Bouzouaia, 2007) (Chaabani, 1995).
Une étude menée entre 2005 et 2006, sur les cas humains de brucellose diagnostiqués au laboratoire de microbiologie de l'hôpital la Rabta, a rapporté l'identification de ***B. abortus*** (Zribi et *al*., 2009).



Figures 3.14 : Distribution géographique de la brucellose humaine en Tunisie de 1989 à 2006 selon la répartition des cheptels (Benzarti et *al*., 2011).

3.2.6.3 En Algérie

Les premières descriptions de la brucellose humaine ont été faites en 1895 par Cochez et 1899 par Legrain (Benhabyles, 1992b). Gillot, Lemaire, Soulié et Gardon étudièrent pour la première fois cette maladie à Alger en 1907 (Sergent et *al*., 1908a).

Il faut attendre les années 1980 pour retrouver l'étude de Cherif et al. qui rapportent que sur 994 sérums examinés entre 1976 à 1983 à l'Institut Pasteur d'Algérie, 24 sérums seulement se sont révélés positifs, soit un pourcentage de 2,4% (Cherif et *al*., 1986). Alors que Benhabyles rapporte qu'aucun cas de brucellose n'a été déclaré aux autorités sanitaires jusqu'en 1984. La

recherche bibliographique a permis de retrouver dans les articles scientifiques 2 à 3 cas hospitalisés à Maillot. La brucellose était considérée comme maladie rare jusqu'en 1984, date à laquelle une épidémie s'est déclarée à Ghardaïa. En effet, en 1984, suite à une flambée épidémique à Ghardaïa, environs 600 cas cliniques ont été déclarés dont 248 confirmés par le laboratoire de l'IPA (Benhabyles, 1992a, 1999) (Benhabyles, 1992a, 1999; Klouche, 1990). Une enquête épidémiologique dans cette wilaya a révélé un taux d'infection de 40,7%. L'origine de cette épidémie est directement liée aux traditions alimentaires : la consommation d'un fromage fabriqué à partir de lait de chèvre cru (Cherif et *al.*, 1986).

La maladie était peu déclarée chez l'homme car peu diagnostiquée ou méconnue. Par la suite et du fait de l'amélioration du diagnostic, le nombre de cas n'a cessé d'augmenter :

En 1986, dans l'Ouest du pays, la wilaya de Tlemcen enregistre les premiers cas. Depuis le nombre de cas ne cesse d'augmenter d'année en année (Benhabyles, 1992b ; Benchouk, 1990). En 1989, à l'Est du pays, apparition d'une importante épidémie dans la wilaya de Sétif.

Au sud, en 1989, on a enregistré 203 cas à Ghardaïa. En 1991, El Bayadh a connu une importante épidémie avec un taux d'infection de 56,8%. En 1994, un foyer épidémique s'est déclaré dans la wilaya d'El Oued, qui n'avait présenté auparavant qu'un seul cas en 1989; et n'a jamais été considérée comme foyer de brucellose (Korichi & Rahal, 1995).

De plus en plus de cas de brucellose sont identifiés depuis qu'on la recherche systématiquement devant des tableaux cliniques divers et lors d'enquêtes épidémiologiques. La brucellose touche pratiquement tout le pays et sévit à l'état endémique mais a connu au cours des dernières décennies des flambées épidémiques (Benhabyles, 1992b). Ce sont surtout les wilayas d'élevages caprins qui notifient les incidences les plus élevées notamment celles des Hauts-plateaux et du sud (voir fig. 3.17).

Les enquêtes sérologiques effectuées par différentes équipes retrouvent:

À l'ouest, Boudilmi et al. ont retrouvé 422 cas de brucellose confirmés positifs sur 928 sérums reçus (45,5%) au niveau du laboratoire de Tlemcen entre 1986 et 1990 (Boudilmi et *al*., 1990).

À l'est, une première enquête qui avait porté sur 18 domaines agricoles de la wilaya de Sétif, avait trouvé 6,8% de travailleurs agricoles séropositifs. Alors qu'une deuxième étude entre 1987-1989 révélait un taux de 4,25% (Hamdi-Cherif et *al*., 1990). Mehelmi a étudié un cas d'un foyer de brucellose humaine et animal à Constantine révéla un taux d'infection de 16,38% (Mehelmi et *al.*, 1990). Tourab et al. ont étudié l'épidémiologie de la brucellose professionnelle dans la wilaya de Annaba, et ont révèle un taux d'infection de 6,5% (Tourab et *al.*, 1990).

Au sud, Korichi et Rahal retrouvent un taux de 22,34% à El Oued durant l'année 1994-1995 (Korichi & Rahal, 1995).

Actuellement, l'Algérie occupe la 10ème place au monde concernant le nombre de cas de brucellose humaine déclarés annuellement (Pappas et *al*., 2006). En Algérie, la brucellose occupe la deuxième place par rapport aux zoonoses à déclaration obligatoire (voir fig. 3.15) (REM, 2010).

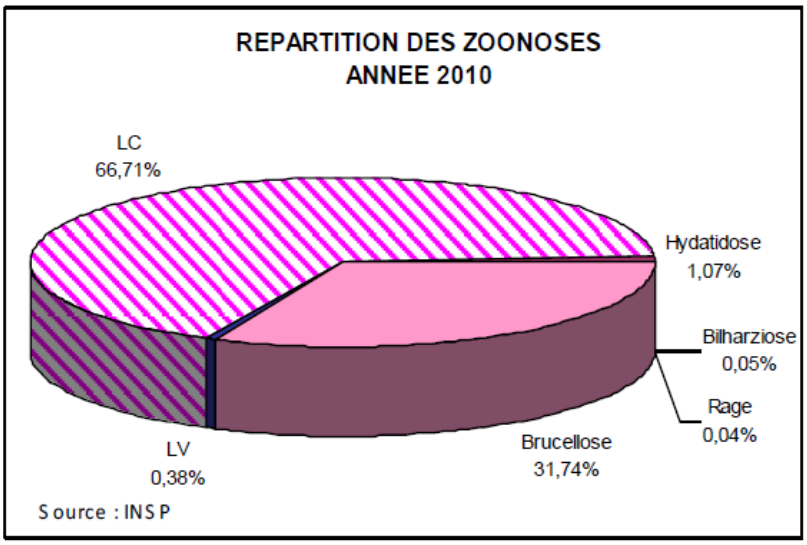
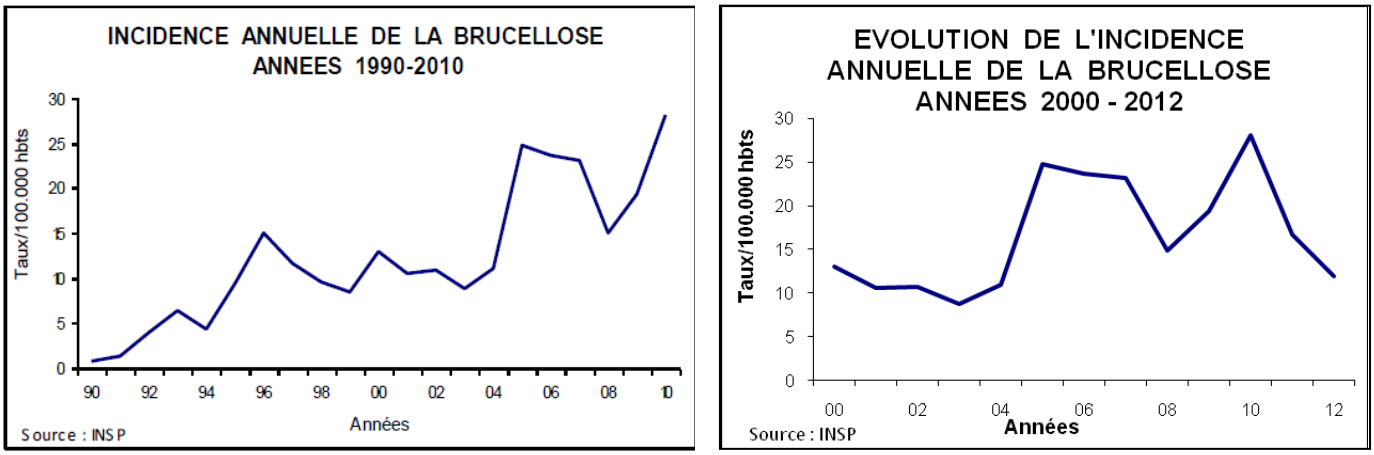


Figure 3.15 : Répartition des zoonoses en Algérie en 2010 (LC : leishmaniose cutanée ; LV : leishmaniose viscérale) (REM, 2010).

Une amélioration est enregistrée fin des années 90, suite à des actions de lutte. Mais cette amélioration n'est pas constante, elle est dépendante des actions de préventions entreprises sur le terrain. Au cours de la décennie 2000, le taux d'incidence de la brucellose a fluctué entre 8 et 28 cas pour 100.000 habitants (voir fig. 3.16) (INSP, 2011).



Figures 3.16: évolution de l'incidence annuelle de la brucellose humaine en Algérie de 1990 à 2012 (REM, 2010 ; REM, 2012)

Au cours de l'année 2011, on note une diminution du taux d'incidence de la brucellose. En effet, le taux est passé de 28,04 cas/100000 hab. (10014 cas) en 2010, à 16,74 cas/100000 hab. (6123 cas) en 2011. Cette baisse est enregistrée au niveau de plusieurs wilayas : El Bayadh, Nâama, Béchar et Laghouat (voir fig. 3.17) (REM, 2011 ; REM, 2010).

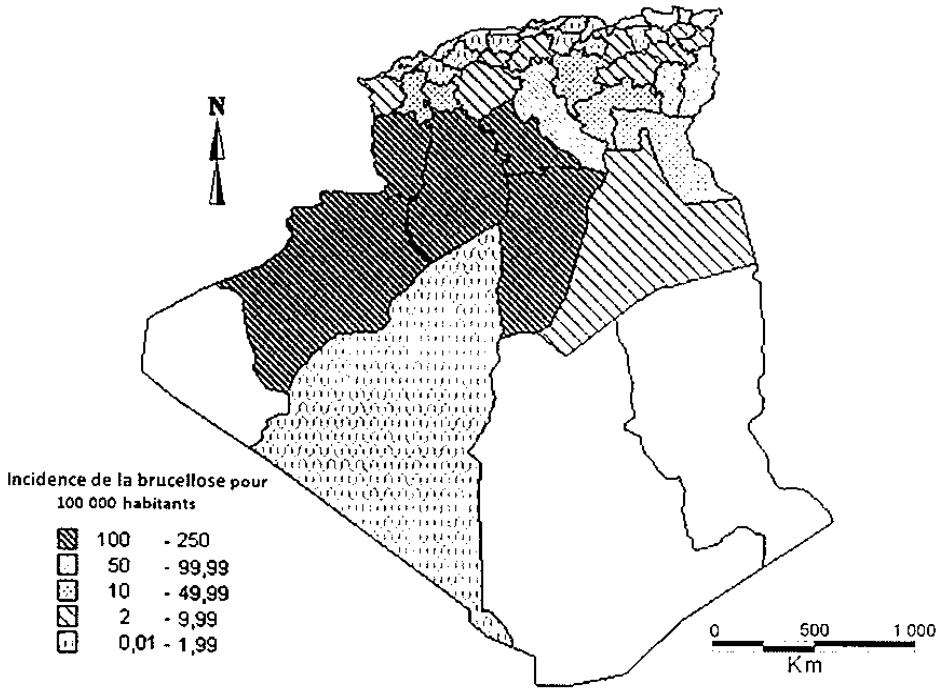


Figure 3.17 : répartition de la brucellose humaine en Algérie pour l'année 2011 (INSP, 2011).

a) Caractéristique de la brucellose humaine en Algérie

i) Sexe

La répartition par le sexe montre une prédominance masculine quand l'exposition est professionnelle (Benhabyles, 1992 b ; Boudilmi et al., 1990 ; Hamdi-Cherif, 1990 ; Benchouk, 1990 ; Benhabyles et al., 1990). Quand la contamination est d'origine alimentaire, les deux sexes sont également atteints (Benhabyles, 1992 b ; Klouche, 1990 ; Benhabyles, 1990). Pour l'année 2011, on constate une légère prédominance du sexe masculin (INSP, 2011).

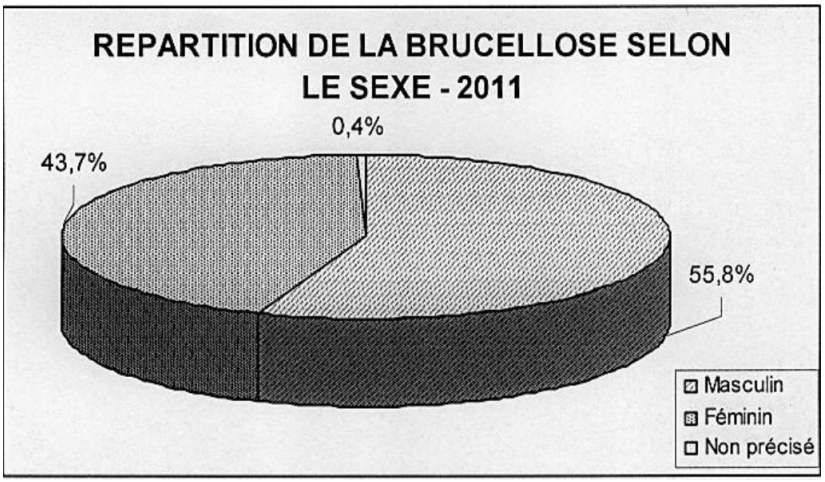


Figure 3.18 : Répartition des cas de brucellose en fonction du sexe pour l'année 2011 (INSP, 2011).

ii) Age

Tous les âges sont touchés, mais elle prédomine chez l'adulte (Benhabyles, 1992 b ; Hamdi-Cherif, 1990 ; Benhabyles, 1999 ; Benchouk, 1990 ; Benhabyles et *al.*, 1990). Durant les années 2010 à 2012, elle prédomine dans les tranches d'âge de 20-29 ans et 40-49 ans (REM,2011 ; REM, 2010, REM, 2012).

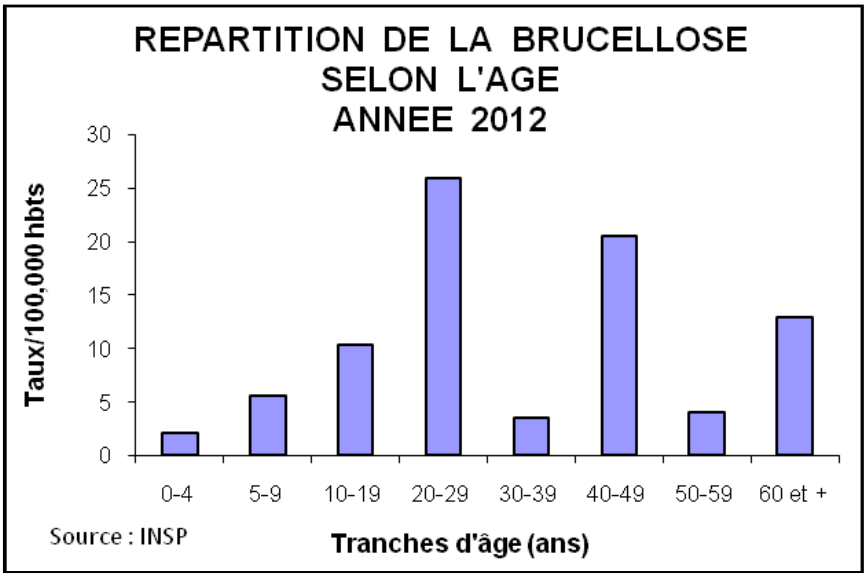


Figure 3.19 : répartition des cas de brucellose humaine selon l'âge (REM, 2012).

iii) Mode de contamination

La répartition selon le mode de contamination montre qu'en dehors de l'épidémie de 1984 où la contamination par ingestion de fromage frais a été retrouvée dans 100% des cas; l'origine de l'épidémie a été l'ingestion de fromage frais de chèvre de fabrication artisanale: la «Kemaria», très prisé dans la région, qui encore en 1989 a été à l'origine de 2/3 des cas (Benhabyles, 1992 b ; Cherif et al., 1986 ; Klouche, 1990). Le mode de contamination est dans 60% des cas alimentaire par ingestion de lait cru et des produits laitiers, dans 10% des cas d'origine professionnelle exclusive et dans 30% des cas mixte (Benhabyles, 1992 b ; Benchouk, 1990 ; Korichi & Rahal, 1995; Ould-Metidji et al., 1990). Cette proportion (10%) serait certainement plus importante si la surveillance sérologique systématique était pratiquée chez les travailleurs exposés et le diagnostic posé devant les tableaux cliniques trompeurs (Benhabyles, 1992 b ; Hamdi-Cherif, 1990 ; Tourab et *al.*, 1990 ; Mokhtari & Bengougam, 1990).

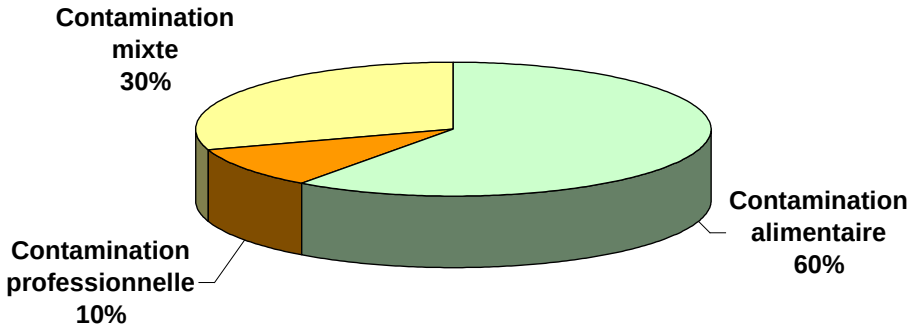


Figure 3.20 : Répartition des cas de brucellose en fonction du mode de contamination années 1988 à 1991 (Benhabyles, 1992 b)

iv) Répartition au cours de l'année

La brucellose sévit toute l'année, mais on note cependant une incidence élevée en printemps et en été, période de mise bas et de pleine lactation (Benhabyles et al., 1990 ; Benhabyles, 1992 b ; Benhabyles, 1999). Cette même augmentation saisonnière est constatée chez les ruminants domestiques (caprins et bovins).

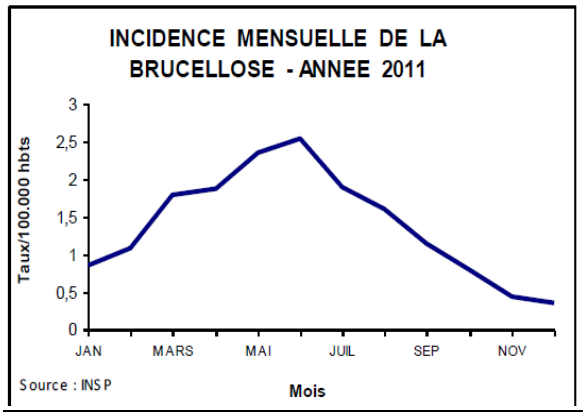


Figure 3.21: incidence mensuelle de la brucellose humaine en Algérie pour l'année 2011 (REM,2011)

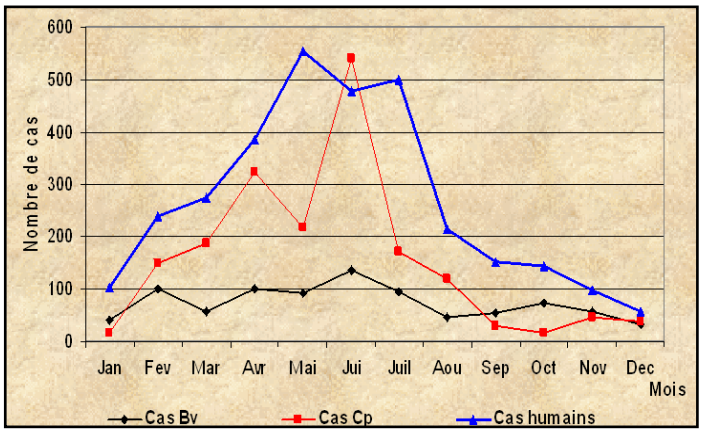


Figure 3.22 : évolution mensuelle du nombre de cas humains par rapport aux cas caprins et bovins (2001) (Ouadahi et *al.*, 2004)

b) Les souches de *Brucella* identifiées chez l'Homme en Algérie

L'identification bactériologique des *Brucella* est rarement effectuée par manque de laboratoires appropriés pour cette recherche. Néanmoins, nous retrouvons les données des diagnostics bactériologiques effectués au niveau du laboratoire de bactériologie médicale de l'IPA, de la période allant de 1991 à 2004, qui rapportent l'identification de 69 souches de ***Brucella melitensis***, dont 65 ***B. melitensis bv 3***, une ***B. melitensis bv 2*** (Korichi-Ouar et *al.*, 2005).

Deux études à l'Ouest du pays (Boudilmi et al en 1990 et Aggad et al en 2002-2003 à Tiaret), ainsi qu'une autre étude à Alger entre 2000-2003, rapportent l'isolement de ***B. melitensis bv 3*** sur des prélèvements humains (Aggad and Boukraa, 2006; Benslimani et *al.*, 2005; Boudilmi et *al.*, 1990).

B. melitensis semble être l'espèce exclusive isolée chez l'humain et les animaux, et le biovar 3 de *B. melitensis* semble être le biovar dominant en Algérie.

CHAPITRE 4
TYPAGE DES *BRUCELLA*

CHAPITRE 4
TYPAGE DES *BRUCELLA*

4.1 Typage phénotypique des *Brucella*

4.1.1 Mesures de sécurité

Les manipulations des prélèvements et des cultures bactériennes de *Brucella* doivent être impérativement réalisées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) ou, mieux, dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (NSB3). Car le risque de contamination du personnel technique est élevé (Lavigne et al., 2011). Le personnel devra avoir reçu une formation adéquate, il devra porter des vêtements de protection appropriés. Le laboratoire devra disposer d'installations pour la décontamination des appareils, cultures rejetées et autres produits dangereux (comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose, 1986).

4.1.2 Prélèvements

Les prélèvements destinés aux examens bactériologiques doivent être expédiés, refroidis (5±3)°C, en récipient étanche et isotherme, le plus rapidement possible. L'emballage doit être conforme aux normes en vigueur concernant l'expédition de produits biologiques potentiellement dangereux pour la santé humaine.

Tout prélèvement ne pouvant être expédié dans les 24h doit être congelé à une température inferieure ou égale à -16°C. A la réception au laboratoire, si le prélèvement ne peut être traité immédiatement, il doit être congelé à une température inferieure ou égale à -16°C.

La technique de recherche par culture des *Brucella* étant peu sensible et les prélèvements renfermant parfois un faible nombre de *Brucella*, il est recommandé de multiplier les prélèvements. Pour obtenir une sensibilité optimale, on privilégie (Norme AFNOR NF U 47-105 ; Garin-Bastuji et *al.*, 1990 ; Alton et al., 1988) :

4.1.2.1 Sur l'animal vivant

a) Sang : l'hémoculture ne présente que peu d'intérêt en brucellose animale. Les prélèvements de sang sont donc le plus souvent destinés aux examens sérologiques.

b) Lait : les prélèvements seront réalisés après lavage, désinfection et séchage des trayons. Il est nécessaire de prélever tous les quartiers , à raison de 10 à 20ml de lait chacun.

Les deux premiers jets de lait sont éliminés et le prélèvement recueilli dans un récipient stérile.

c) Prélèvements vaginaux : les sécrétions vaginales sont prélevées par écouvillonnage des parois et surtout du fond de la cavité vaginale. On utilise un écouvillon : écouvillon du col de l'utérus (région péri- et endocervicale) ou, à défaut, du vagin.

d) Produits d'avortement :

- **Enveloppes fœtales :** lors d'un avortement ou lors de naissance à terme de femelle infectées, certaines parties des enveloppes fœtales renferment de grandes quantités de *Brucella*. On prélève plusieurs cotylédons atteints (jaune sale ou grisâtre).
- **Avorton :** l'avorton entier et ses annexes (estomac ou ponction du contenu, rate, poumon, méconium, organes génitaux, différents ganglions lymphatiques, métacarpiens désarticulé.

e) Sperme : le prélèvement doit être effectué par un technicien spécialisé.

f) Urine : le prélèvement est effectué par sondage aseptique.

g) Liquide d'arthrite ou d'hygroma : le prélèvement est effectué par ponction.

4.1.2.2 Sur l'animal mort

Les prélèvements de choix sont :

- les tissus du système réticulo-endothélial : les nœuds lymphatiques, on privilégie ceux de la tête (rétropharyngiens, parotidiens et sous maxillaires), ceux de la sphère génitale (rétromammaires, iliaques internes, lombaires ou inguinaux) ; rate et foie.
- L'utérus gravide et la mamelle,
- les testicules et épididymes.

4.1.3 Isolement des *Brucella*

4.1.3.1 Mise en culture des prélèvements :

(Norme AFNOR NF U 47-105 ; Garin-Bastuji et *al.*, 1990 ; Alton et al., 1988)

Les *Brucella* étant souvent présentes en très faible nombre dans les prélèvements, il est préférable de multiplier les prélèvements et d'ensemencer plusieurs boites.

a) Lait : est centrifugé à 2000 g pendant 15 min. L'ensemencement est effectué à partir de la crème d'une part, du culot d'autre part, par étalement de l'un et l'autre à la surface du milieu.

b) Prélèvements vaginaux : l'écouvillon est retiré stérilement du tube et frotté à la surface du milieu de culture.

c) Enveloppe fœtales : souvent contaminés, il est préférable de procéder au préalable à plusieurs lavages en soluté salin isotonique stérile, avant ensemencement. Il est également possible de prélever l'intérieur du cotylédon au moyen d'une pipette Pasteur. L'ensemencement est réalisé en frottant à la surface de la gélose le liquide prélevé ou des fragments de cotylédon découpés en tranches au moyen de ciseaux stériles.

d) Avorton : le contenu stomacal est étalé directement à la surface du milieu à l'aide d'une anse. Pour les tissus, les couper en tranches avec des ciseaux stériles puis les frotter à la surface du milieu. Le méconium est frotté de même directement.

e) Urine : est centrifugée à 2000 g pendant 15min et le culot ensemencé par étalement à la surface de la gélose.

f) Tissus et organes : doivent faire l'objet d'un broyage fin, le plus complet possible (broyeur électrique type stomacher), en présence si nécessaire de STP ou PBS (solution saline tamponnée au phosphate) dans la proportion de ½ à 1/5 de manière à obtenir une suspension ni trop liquide ni trop dense pour l'ensemencement. La suspension est étalée à la surface de milieu. Un dégraissement et un pré-découpage préalable du prélèvement au moyen de ciseaux ou d'un bistouri stériles permet souvent d'obtenir plus rapidement une suspension homogène lors du broyage. A défaut de stomacher, découper en tranches et frotter à la surface du milieu.

4.1.3.2 Milieux de culture

a) Milieux de base

L'isolement direct et la culture des *Brucella* sont habituellement réalisés sur milieu solide. Cette méthode est la méthode de choix car elle permet le développement de colonies pouvant être isolées et aisément reconnues. De tels milieux limitent également l'apparition de mutants rugueux et le développement excessif de contaminants.
Une grande variété de milieux de base commerciaux déshydratés est disponible, tels que le milieu de base pour *Brucella* (*Brucella* medium base), la gélose trypticase (ou tryptone)-soja (TSA). L'ajout de 2 à 5 % de sérum de bovin ou de cheval est nécessaire pour la croissance de souches telles que *B. abortus* biovar 2 et beaucoup de laboratoires ajoutent systématiquement du sérum aux milieux de base tels que la base pour gélose au sang ou la gélose Columbia avec d'excellents résultats.
D'autres milieux sont satisfaisants tels que la gélose sérum-dextrose (serum-dextrose agar [SDA]) ou glycérol dextrose. Le SDA est généralement privilégié pour l'observation de la morphologie des colonies. Un milieu non sélectif et biphasique, le milieu de Castañeda, est recommandé pour l'isolement des *Brucella* à partir du sang et d'autres fluides biologiques comme le lait, pour lesquels un enrichissement est souhaitable. Ce milieu est utilisé du fait de la tendance des *Brucella* à dissocier en bouillon et la présence de bactéries rugueuses peut

nuire au biotypage de la souche isolée (Manuel OIE, 2014).

b) Milieux sélectifs

Tous les milieux de base cités plus haut peuvent être utilisés pour la préparation des milieux sélectifs. Une série d'antibiotiques est ajoutée pour inhiber la croissance de micro-organismes autres que *Brucella*. Le milieu sélectif le plus utilisé est le **milieu de Farrell**, préparé par l'ajout de 6 antibiotiques au milieu de base : polymyxine B sulfate; bacitracine; natamycine ; acide nalidixique; nystatine; vancomycine. Un supplément antibiotique lyophilisé est disponible dans le commerce.

Aussi, la sensibilité du diagnostic augmente-t-elle significativement lorsqu'on utilise le milieu modifié de Thayer-Martin simultanément au milieu de Farrell. Le milieu modifié de Thayer-Martin peut être préparé à partir d'une base de milieu GC à laquelle sont ajoutées hémoglobine, ainsi que colistine, vancomycine, nitrofurantoïne, nystatine et amphotéricine B (Manuel OIE, 2014).

4.1.3.3 Incubation et lecture

Les boites sont incubées à (37±2)°C, pour moitié en atmosphère normal, pour moitié en atmosphère renfermant 5 à 10% de CO_2. Les colonies de *Brucella* n'apparaissant pas avant 2 à 3 jours d'incubation, parfois plus tard sur milieu sélectif, les boites sont examinées régulièrement , jusqu'au $10^{ème}$ jour d'incubation.

Les colonies de *Brucella* n'atteignent pas une taille permettant leur observation avant le $3^{ème}$ ou le $5^{ème}$ jour d'incubation. Une recherche minutieuse doit être effectuée, car il est fréquent qu'une boîte ne contienne qu'une seule colonie de *Brucella*. Lorsqu'on observe par transparence les boîtes entre 3 et 5 jours devant une source de lumière de préférence naturelle, les colonies apparaissent translucides, d'un jaune pâle ambré, à bords lisses et réguliers et d'un diamètre d'environ 0,5 mm à 1 mm. Vues de dessus, elles sont convexes et blanc nacré. Plus tard, elles grossissent et jaunissent mais restent translucides.

A cette phase, il est impératif de noter la CO_2-dépendance de la souche isolée. Si la souche est CO_2-dépendante, toutes les cultures ultérieures doivent être effectuées en atmosphère enrichie en CO_2.

Les colonies suspectes sont repiquées sur milieu solide gélosé non sélectif en boite de Petri (Norme AFNOR NF U 47-105).

4.1.4 Identification du genre *Brucella*

L'identification des *Brucella* requiert l'étude des caractères suivants : caractéristiques de croissance, morphologie des colonies, coloration de Gram ou Stamp et morphologie de la bactérie, uréase, oxydase et catalase (Manuel OIE, 2014).

4.1.4.1 Caractères macroscopiques

a) Caractéristiques de croissance

En général les colonies des *Brucella* deviennent visibles au bout de 3 jours. Elles sont rondes, à bord lisses, translucides, de couleur pâle et légèrement bleutées, et d'un diamètre de 1 à 2mm après 3-4 jours de culture, mais la croissance peut être plus lente sur milieu sélectif (Garin-Bastuji et *al.*, 1990).

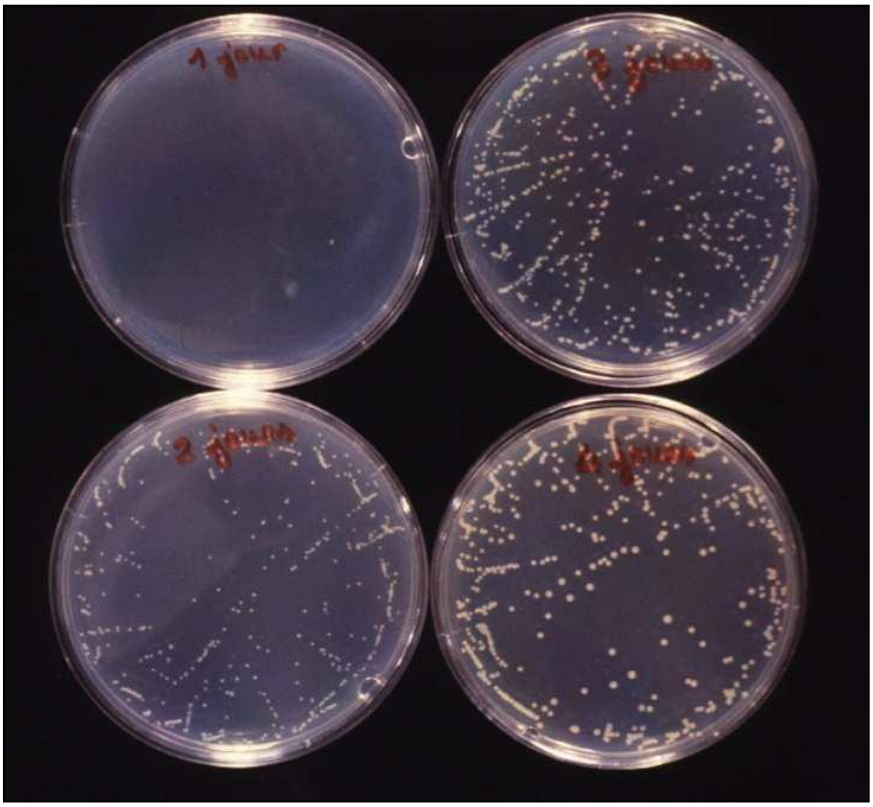


Figure 4.1 : évolution de la croissance de *B. melitensis* (Garin-Bastuji, 2012)

b) Morphologie des colonies

Les *Brucella* naturellement en phase lisse « S » peuvent évoluer spontanément vers la phase rugueuse « R ». Il est impératif que la morphologie des colonies soit contrôlée avant mise en œuvre des épreuves de typage, afin de déterminer le caractère lisse ou rugueux des colonies. Les caractéristiques des différents biovars de *Brucella* ne sont valables que si leur détermination est réalisée sur des bactéries parfaitement « S ». Les méthodes recommandées pour l'observation de la morphologie des colonies sont celles de Henry par transillumination oblique, le test de l'acriflavine de Braun et Bonestell ou la méthode de coloration des colonies au cristal violet de White et Wilson (Manuel OIE, 2014 ; Garin-Bastuji et *al.,* 1990).

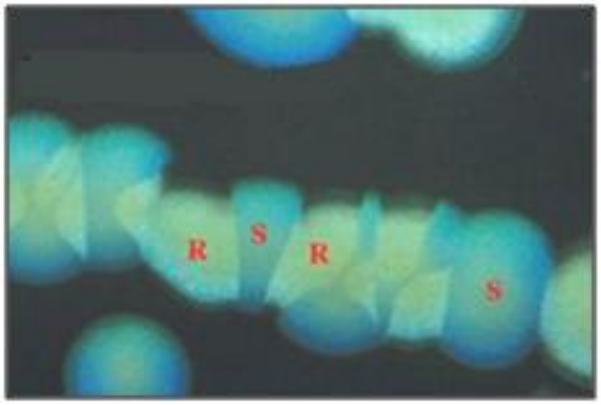


Figure 4.2 : Les colonies de *Brucella* à la lumière réfléchie oblique (Alton et al., 1988)

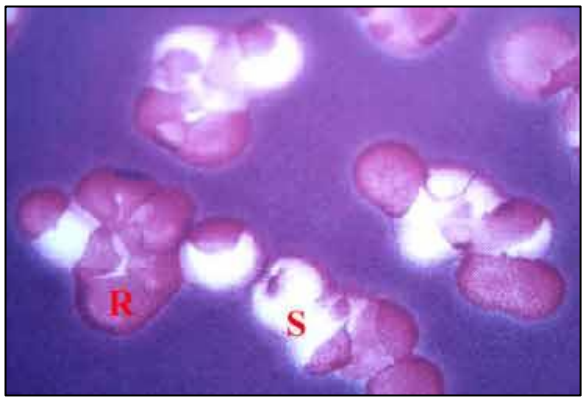


Figure 4.3 : Colonies de *Brucella* colorées au cristal violet (Alton et al., 1988)

4.1.4.2 Caractères microscopiques

a) Coloration de Gram

Les *Brucella* sont des coccobacilles à Gram négatif de longueur variant de 0,6 à 1,5µm et de largeur de 0,5 à 0,6 µm ; généralement isolés, ces germes peuvent se rencontrer par paires ou en amas (Garin-Bastuji et *al.,* 1990).

b) Coloration de Stamp

Les *Brucella* apparaissent, isolées ou en amas, colorées en rouge sur fond bleu, le plus souvent intracellulaires (Garin-Bastuji et *al.,* 1990).

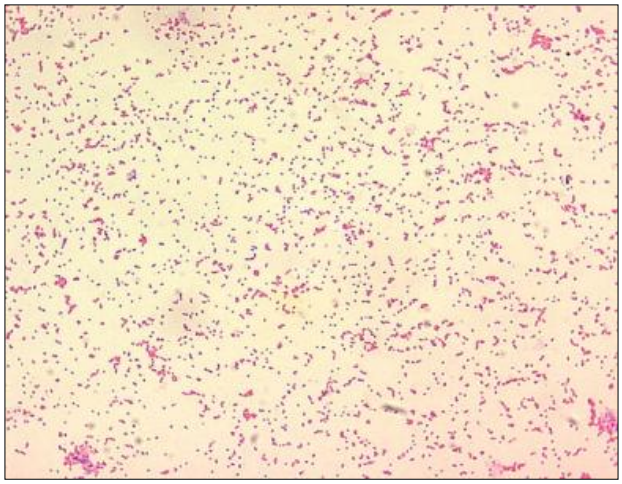


Figure 4.4 : *Brucella* spp. Coloration de Gram (Stauffer, 2002)

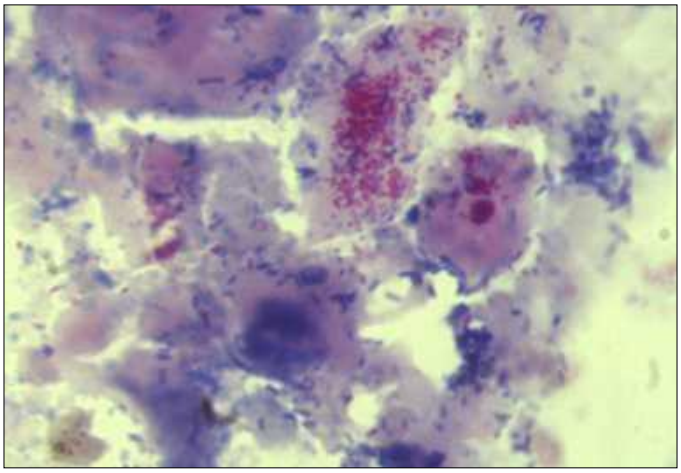


Figure 4.5 : *Brucella spp.* coloration de stamp (Garin-Bastuji, 2012)

4.1.4.3 Test de l'uréase

Pour cette épreuve, on utilise le milieu de Christensen, à température ambiante. Si la souche est uréase +, le milieu gélosé vire plus ou moins rapidement du jaune au rouge framboise ; si la souche est uréase -, le milieu ne vire pas.
Les *Brucella* sont généralement uréase + sauf *B. ovis* et la souche de référence de *B. abortus* biovar 1 (souche 544) (Norme AFNOR NF U 47-105).

4.1.4.4 Test de l'oxydase

Déposer la culture prélevée sur papier filtre imprégné d'une solution à saturation de N.N. diméthyl p. phénylène diamine hémioxalate salt. Le filtre se colore presque instantanément en rose si la souche est oxydase +.
Les *Brucella* sont généralement oxydase +, sauf *B. ovis*, *B. neotomae* et certaine souches africaines de *B. abortus* bv 3 (Norme AFNOR NF U 47-105).

4.1.5 Typage de l'espèce et du biovar des *Brucella*

L'identification de l'espèce et celle du biovar requièrent des épreuves telles la lyse par les phages et l'agglutination par les sérums spécifiques anti-A, -M ou -R. L'utilisation en parallèle de plusieurs bactériophages tels que Tbilissi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar (Iz) et R/C permet une identification pratique des espèces lisses et rugueuses de *Brucella*, la dépendance en CO_2, la production d'H_2S, la croissance en présence de fuchsine basique ou de thionine aux concentrations finales de 20 µg/ml (Manuel OIE, 2014).

4.1.5.1 Besoin en CO_2

Le besoin en CO_2 est déterminé lors de l'isolement de germe à partir du prélèvement, puisque l'ensemencement est fait sur milieux placés à 37°C en atmosphère ordinaire, ainsi que sous une atmosphère de 10% de CO_2 (Garin-Bastuji et *al.*, 1990).

4.1.5.2 Agglutination par les sérums monospécifiques

L'agglutination par les sérums spécifiques anti-A, -M ou –R. En effet, les cultures de *Brucella* qu'elles soient lisses ou rugueuses sont agglutinées par leur antisérum respectif. Les cultures lisses peuvent être agglutinées par les sérums monospécifiques A ou M, selon l'antigène prédominant (Alton et al., 1988).

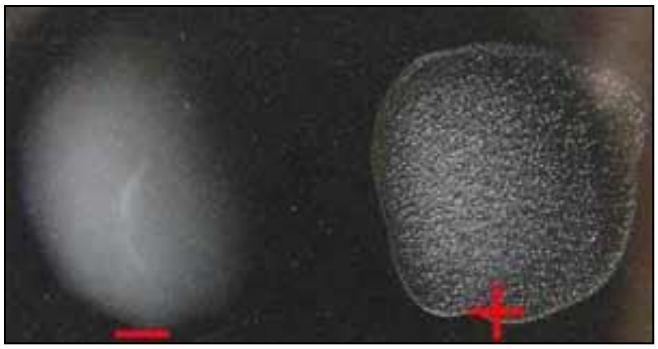


Figure 4.6 : agglutination de sérums monospécifiques (http://www.microbes-edu.org)

4.1.5.3 Lyse par les bactériophages ou lysotypie

Pour évaluer la sensibilité à différents bactériophages. Il existe de nombreux phages actifs sur *Brucella* (Tb, Wb, Iz, R/C), ces brucellaphages, ne lysent pas les bactéries d'autres genres, par exemple le phage Tbilisi (Tb) lyse exclusivement les brucelles dont le métabolisme d'oxydation est caractéristique de *B. abortus*. Seules les bactéries en phase lisse "S" sont sensibles aux bactériophages. Le phage R/C provoque la lyse de la plupart des cultures non lisses (comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose, 1986).

Tableau 4.1: Caractéristiques différentiels des espèces de *Brucella* (OIE *Terrestrial Manual*, 2009)

			Lyse par les phages[a]							
			Tb		Wb	Iz_1	R/C			
Espèces	Morphologie colonies[b]	Besoin en sérum	DCE[c]	10^4 DCE	DCE	DCE	DCE	oxydase	uréase	Hôte préférentiel
B. abortus	S	-[d]	+	+	+	+	-	+[e]	+[f]	Bovins et autres Bovidés
B. suis	S	-	-	+	+[g]	+[g]	-	+	+[h]	Biovar 1 : porc Biovar 2 : Porc, Lièvre Biovar 3 : porc Biovar 4 : renne Biovar 5 : rongeurs sauvages
B. melitensis	S	-	-	-	-[i]	+	-	+	+[j]	Ovins et caprins
B. neotomae	S	-	-[k]	+	+	+	-	-	+[h]	Rat du désert[l]
B. ovis	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Béliers
B. canis	R	-	-	-	-	-	+	+	+[h]	Chiens
B. ceti	S		+[m]		+[n]	+[o]	-	+	+	Cétacés
B. pennipedialis	S		+[m]		+[n]	+[o]	-	+	+	pinnipèdes
B. microti	S	-	-	+	+	+	-	+	+	Campagnol des champs

a Phages: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz1) et R/C
b Phase naturelle : S: lisse, R: rugueuse
c DCE : dilution courante d'épreuve
d Le biovar 2 de *Brucella abortus* nécessite habituellement du sérum à l'isolement primaire
e Sauf certaines souches africaines de *B. abortus* biovar 3 qui sont négatives
f Moyennement rapide, sauf la souche 544 et quelques souches de terrain qui sont négatives
g Certaines souches de *B. suis* biovar 2 ne sont pas lysées ou le sont partiellement par les phages Wb ou Iz1
h Rapide
i Certaines souches sont lysées par le phage Wb
j Peu rapide, certaines souches étant rapides
k Plages de lyse
l *Neotoma lepida*
m quelques souches sont lysées par Tb
n la plupart des souches sont lysées par Wb
o la plupart des souches sont lysées par Iz

4.1.5.4 Sensibilité aux colorants

On recherche la croissance de la souche en présence de colorants : thionine et fuchsine basique. Pour cela, on préparer des boites de milieu Blood-Agar-Base + 5% de sérum de cheval contenant de la fuchsine et de la thionine aux concentrations 1/50000 et 1/100000. On ensemence la gélose par une strie à l'aide d'un écouvillon trempé dans la suspension préparée. Puis on incube à 37°C dans une atmosphère contenant 10% de CO_2. La lecture se fait au bout de 3 jours, on note la présence ou l'absence de croissance (Garin-Bastuji et *al.*, 1990).

4.1.5.5 Production d'H_2S

Détectée sur du papier à l'acétate de plomb, on ensemence la culture sur une pente de milieu Blood-Agar-Base (BAB2). La lecture se fait au bout de 24h : l'extrémité du papier à acétate de plomb noircit lorsqu'il y a production d'hydrogène sulfuré (Garin-Bastuji et *al.*, 1990).

Tableau 4.2 : caractéristiques différentiels des biovars de *Brucella* (OIE *Terrestrial Manual*, 2009)

Espèces	Biovars	Besoin en CO_2	Production H_2S	Sensibilité aux colorants [a]		Agglutination avec sérums monospécifiques		
				Thionine	Fuchsine basique	A	M	R
B. melitensis	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
B. abortus	1	+[b]	+	-	+	+	-	-
	2	+[b]	+	-	-	+	-	-
	3	+[b]	+	+	+	+	-	-
	4	+[b]	+	-	+[c]	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+ou-	+	+	+	-	+	-
B. suis	1	-	+	+	-[d]	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	-[e]	+	+	-
	5	-	-		-	-	+	-
B. neotomae	-	-	+	-[f]	-	+	-	-
B. ovis	-	+	-	+	-[e]	-	-	+
B. canis	-	-	-	+	-[e]	-	-	+
B. ceti	-	-	-	+	+	+	-[e]	-
B. pinnipedialis	-	+	-	+	+	+	-[e]	-
B. microti	-	-	-	+	+	-	+	-

a Concentration du colorant : 20 µg/ml

b En général positif lors de l'isolement primaire
c Quelques souches ne croissent pas sur colorants
d Quelques souches résistantes à la fuchsine ont été isolées
e Absence de croissance pour la plupart des souches
f Croissance à la concentration de 10 µg/ml de thionine

4.2 Typage moléculaire des *Brucella*

Le « gold standard » pour le diagnostic de la brucellose est l'isolement des *Brucella*. Cependant, pour isoler les *Brucella*, il faut du temps et des d'importantes ressources, ceci requiert un laboratoire niveau 3 et un personnel technique qualifié pour manipuler les échantillons et les bactéries vivantes pour une éventuelle identification et typage. Toute manipulation directe des *Brucella* comporte des risques d'infection en laboratoire, des règles très strictes de biosécurité doivent être respectées.
Afin d'éviter ces inconvénients et ces difficultés, les méthodes de biologie moléculaire basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) deviennent très utiles et des progrès considérables ont été accomplis récemment pour améliorer leur sensibilité, spécificité, leur facilité technique et de réduire leurs coûts. À ce jour, plus de 400 rapports ont été publiés traitant de diverses méthodes basées sur la PCR pour la détection de la brucellose. Ces méthodes sont utilisées avec succès pour l'identification et le typage des *Brucella*, et deviennent des outils très importants d'identification des *Brucella* au niveau espèce et récemment aussi au niveau biovar.
Ces techniques nécessitent un confinement biologique minimum et peuvent fournir des résultats dans un temps très court. En outre, l'empreinte génétique des isolats aide dans les études épidémiologiques de la maladie et de son contrôle. Basées sur la méthode PCR, elles sont plus utiles et pratiques que les méthodes conventionnelles utilisées pour identifier *Brucella*, et de nouvelles méthodes d'identification et le typage sont encore en cours d'élaboration. Cependant, la sensibilité, la spécificité, et les questions de contrôle qualité et d'assurance qualité en utilisant ces méthodes doivent être entièrement validées sur des échantillons cliniques avant PCR, pour être utilisées dans les tests et le diagnostic de routine dans les laboratoires pour la brucellose (Yu and Nielsen, 2010).

4.2.1 Polymorphisme des *Brucella* et les gènes utilisés pour les méthodes moléculaires

4.2.1.1 Gène *bcsp31*

En 1979, quatre protéines périplasmiques sont identifiées et appelées *« Brucella cell surface protein »*, parmi lesquelles, une protéine de 31 kDa codée par le gène *bcsp31* qui a été cloné et séquencé par la suite. BCSP31 est une protéine immunogène, très conservée au sein du genre *Brucella*, mais cependant absente chez *B. ovis.* Le locus de *bcsp31* est le premier à avoir été cloné et séquencé, ce qui a conduit de nombreux auteurs à l'utiliser comme gène de référence dans le diagnostic moléculaire (Bounaadja, 2010).

4.2.1.2 Séquence d'insertion IS*711* ou IS*6501*

C'est en 1990 qu'une séquence d'insertion (IS) est découverte dans le génome de *Brucella ovis*, en remarquant une insertion en aval de la séquence du gène *bcsp31*, empêchant l'expression de la protéine (Halling and Zehr, 1990). En 1993, elle est caractérisée et séquencée à partir de *Brucella ovis*, et on lui donne l'appellation de IS*711* (Halling et al., 1993) ou de IS*6501* (Ouahrani et al., 1993). Il est également constaté que la séquence est présente en plusieurs copies, mais en nombre variable d'une espèce à l'autre. Puis, 4 nouvelles IS sont identifiées par Godfroid et collaborateurs : IS*Bm1*, IS*Bm2*, IS*Bm3* et IS*Bm4* (Godfroid et al., 2000), ainsi que l'IS*2020* (Halling and Zuerner, 2002). Son nombre de copies, sa distribution au sein du génome des *Brucella* et sa spécificité font de l'IS*711* la séquence d'insertion la plus étudiée. L'IS*711* n'a été identifié que dans le génome de *Brucella* spp. avec un nombre de copies allant de 6 copies pour *B. canis* par exemple, à 38 copies pour *B. ovis* (Halling et al., 1993 ; Ouahrani et al., 1993), ce qui la rend spécifique du genre *Brucella*. Sa spécificité et sa stabilité en font un marqueur intéressant de genre, d'espèces et de biovars de *Brucella*.

4.2.1.3 Protéines membranaires (*omp*)

Des gènes de *Brucella* codant pour les protéines majeures de la membrane externe (Outer Membrane Proteins "OMP"), se sont révélés être intéressants pour le typage moléculaire des *Brucella* et certains de leurs biovars. La principale OMP de 36 kDa de la porine est codée dans le locus ***omp2***, séquencée pour la première fois chez *B. abortus*. Le locus est composé de deux gènes étroitement apparentés: ***omp2a*** et ***omp2b***.

La première mise en évidence du polymorphisme au locus *omp2*, entre les espèces de *Brucella*, montre que toutes les souches de référence des différentes espèces de *Brucella* portent une copie des deux - *omp2a* et *omp2b* - à l'exception de *B. ovis*, à qui manque l'*omp2b* et possède deux copies de *omp2a*, et les souches marines ont deux copies d'*omp2b* et manque d'*omp2a* (Cloeckaert et al., 1996; Vizcaíno et al., 2000).

Deux autres gènes de *Brucella* codant pour les OMP majeures, ***omp25*** et ***omp31***, ont été clonés et séquencés. L'homogénéité d'omp25 entre les espèces de *Brucella* a été confirmée par séquençage du gène dans les souches types des six espèces. Chaque souche type a révélé une séquence d'*omp25* spécifique. *Brucella* spp. *omp31* montre un degré de polymorphisme entre *omp2* et *omp25* par PCR-RFLP, en fournissant des marqueurs spécifiques de *B. canis, B. ovis* et le biovar 2 de *B. suis.* Plus des marqueurs d'ADN, l'intérêt de *omp31* réside dans le fait que le gène est absent de toutes les biovars de *B. abortus* (Cloeckaert et al., 1996; Vizcaíno et al., 2000).

Les gènes codant pour trois OMP mineures, ***omp10***, ***omp16*** et ***omp19***, ont également été utilisés pour mettre en évidence des polymorphismes d'ADN dans le genre *Brucella*. Mais un pauvre polymorphisme a été trouvé avec les trois gènes (Vizcaíno et al., 2000).

4.2.1.4 Protéine périplasmique BP26

Le gène *bp26* code pour une protéine périplasmique immunogénique de 26kDa. Le gène a été cloné et séquencé en 1996 à partir des espèces *B. abortus* et *B. melitensis*. La même année, la protéine avait été identifiée par microscopie électronique et cytométrie de flux de façon erronée comme étant une protéine de la membrane externe et avait été nommée Omp28. Il a été montré que BP26 est fortement reconnue par des anticorps de sérums issus d'animaux infectés, contrairement aux anticorps issus de sérums d'animaux vaccinés. Cette protéine représente donc un antigène de diagnostic intéressant pour la distinction entre des animaux infectés et des animaux vaccinés(Bounaadja, 2010). Le polymorphisme du gène *bp26* a permis de distinguer par PCR les isolats issus de mammifères marins des *Brucella* isolées de mammifères terrestres (Cloeckaert et al., 2000), ce qui suggère son utilisation comme marqueur spécifique des *Brucella* issues de mammifères marins. D'ailleurs, deux cas de neurobrucellose humaine ont pu être identifiés et attribués à des *Brucella* issues de mammifères marins de cette façon (Bounaadja, 2010).

4.2.1.5 Gène pérosamine synthétase (*per*)

Le gène *per* appelé également *rfbE* a été découvert en 1998 et code pour la pérosamine Synthétase. Ce gène *per* a été séquencé et se trouve très conservé au sein du genre *Brucella*. Il est également présent avec des degrés de similarité variés chez *E. hermanni*, *E. coli* O:157, *S.* groupe N O:30, *S. maltophilia*, *V. cholerae* O:1, et *Y. enterocolitica* O:9 (Bounaadja, 2010; Moreno et al., 2002). Les réactions croisées observées en sérologie entre *Brucella* et *Y. enterocolitica* O:9 et la présence du gène *per* chez les deux bactéries ont conduit Lübeck et collaborateurs à mettre en œuvre une PCR multiplexe basée sur ce gène afin de faire la distinction entre ces deux bactéries (Bounaadja, 2010).

4.2.2 Extraction de l'ADN des *Brucella*

La première étape cruciale des méthodes basées sur la PCR est l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons biologiques , puis sa qualité a un impact significatif sur la sensibilité de la méthode (Smirnova et al., 2013). Les méthodes d'extraction d'ADN connues pour influencer la sensibilité des essais de PCR doivent être évalués (Godfroid et al., 2010).

L'extraction de l'ADN est la première étape dans l'exécution de n'importe quel PCR. Des protocoles normalisés pour l'extraction d'ADN existent ou des kits commerciaux peuvent être utilisés. Les cultures primaires de *Brucella* peuvent être utilisées directement. Les échantillons d'essai à partir de laquelle l'ADN peut être extrait plus couramment pour le diagnostic de la brucellose comprennent : les tissus de nouveau-nés ou avortons, le lait, le sang total, le sérum, le sperme, les fluides corporels et des aliments comme le fromage (Bricker, 2002; Yu and Nielsen, 2010).

Cette méthode utilise un tampon de lyse avec des concentrations élevées, le chlorure de sodium, des concentrations élevées de sulfate de dodécyle de sodium, de la proteinase K et une température d'incubation très élevée pour une extraction d'ADN efficace de *Brucella* (la

sensibilité de la PCR était de 5 à 50 UFC de Brucella / ml de lait).
Des échantillons de sang sont souvent utilisés dans le diagnostic de la brucellose humaine à base de PCR. Toutefois, des inhibiteurs influencent fréquemment les résultats de la PCR. C'est pour cette raison, que des échantillons de sérum sont souvent utilisés pour l'extraction de l'ADN pour PCR (Yu and Nielsen, 2010).

4.2.3 Les PCR en Temps réel (PCR-TR)

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'émission et l'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template). La PCR-TR fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle (Poitras and Houde, 2002).
Les principaux avantages de cette technique sont qu'elle peut être réalisée en un temps très court, ne nécessite pas l'analyse électrophorétique et évite les contaminations. Les échantillons qui peuvent être testés par PCR-TR comprennent des cellules en culture de *Brucella*, le sérum, le sang et les tissus (Yu and Nielsen, 2010).
Depuis quelques années, l'utilisation de la technique de PCR en temps réel dans le diagnostic de la brucellose humaine et animale se multiplie.
Des PCR-TR ont été développées pour identifier spécifiquement *B. abortus, B. melitensis* et *B. suis* au niveau de l'espèce, en utilisant le transfert d'énergie de résonance fluorescente. Les amorces en amont utilisées dans ces PCR-TR étaient de la séquence d'insertion IS711; les amorces en aval et les sondes d'hybridation adjacentes étaient conçues à partir de séquences de signature spécifiques à une espèce ou un biovar. Les PCR étaient réalisées en moins de 30 minutes en utilisant un LightCycler en mode temps réel. Les essais ont été testés sur des souches de référence ainsi que des isolats de terrain et se sont révélés spécifiques pour tous les biovars connus de *B. abortus*, *B. melitensis* biovar 1 et *B. suis*. Par conséquent, la spécificité, la sensibilité, la vitesse et la détection en temps réel rendent ces tests attractifs pour une utilisation dans les études épidémiologiques (Redkar et al., 2001).
Une PCR-TR multiplex a été développée pour l'identification rapide de *Brucella* spp., *B. abortus* et *B. melitensis* en un seul test. Des amorces et sondes TaqMan ont été utilisées pour l'essai multiplex. Pour l'identification de *Brucella* spp., les amorces et la sonde ciblent le gène bcsp31. Pour *B. abortus,* elles ciblent le gène d'insertion IS711 en aval du gène alkB, tandis que pour *B. melitensis,* elles ciblent IS711 en aval de BMEI1162. La spécificité accrue de ce test représente une amélioration significative par rapport aux précédents tests PCR ciblant bcsp31. La sensibilité de ce test suggère son utilité pour la détection directe de *Brucella* dans des échantillons cliniques (Probert et al., 2004).

En brucellose humaine, une PCR-TR a été testée sur des sérums, utilisant des amorces de bspc31 (spécifique du genre *Brucella*) et dosage de SYBR Green I pour détecter les *Brucella*

au niveau du genre. Les résultats montrent que la PCR-TR appliquée à des échantillons de sérums était sensible et spécifique lorsqu'elle est testée sur des échantillons témoins négatifs et des sérums provenant de patients atteints de brucellose aigue (Queipo-Ortuño et al., 2005). Une PCR-TR avec des amorces bcsp31 et une sonde Taqman a été développée pour le diagnostic initial et pour différencier entre une brucellose aigue et une brucellose chronique dans des échantillons de sérum. Ces deux PCR-TR sont reproductibles, faciles, minimisent le risque de contamination de laboratoire et rapides. Il pourrait donc constituer une approche prometteuse et pratique pour le diagnostic rapide de la brucellose humaine (Queipo-Ortuño et al., 2008). Une autre étude utilisant les mêmes amorces, indique que ce test est bien adapté pour la confirmation définitive de cas de brucellose, lorsque les cultures de *Brucella* restent stériles et les tests sérologiques démontrent la présence d'anticorps à réaction croisée contre les antigènes de *Brucella* sp. et *Yersinia enterocolitica* O:9 (Debeaumont et al., 2005).
Pour le diagnostic de la brucellose humaine au niveau du genre, trois PCR-TR ont été élaborées et évaluées sur du sang total et des tissus en paraffine. Les amorces et les sondes d'hybridation adjacentes sont de 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer), *omp25* et *omp31*. D'après les résultats, la PCR-TR avec 16S-23S ITS était la plus sensible et spécifique comparée à la culture bactériologique, et pourrait être utilisée pour le diagnostic rapide de la brucellose humaine dans le laboratoire clinique (Kattar et al., 2007).

Une PCR-TR quantitative (Q-PCR) a été réalisée pour suivre l'évolution de la charge d'ADN de *Brucella melitensis* du diagnostic initial jusqu'au suivi post-traitement, chez des patients atteints de brucellose. Sur la base d'une quantification fluorométrique en temps réel de produits de PCR dans le sang. L'ADN de *B. melitensis* était détecté dans les échantillons de sang des patients pendant le traitement et le suivi post-traitement (la charge d'ADN diminue durant le traitement). Ce qui suggère que les bactéries persistent pendant et après la thérapie, malgré un traitement antibiotique approprié et une bonne réponse de l'hôte. Q-PCR était 100% spécifique *pour B. melitensis* et une sensibilité de 100% pour les infections initiales et les rechutes (Navarro et al., 2006)

En brucellose animale, une étude a évalué une PCR-TR pour identifier *Brucella* au niveau du genre en utilisant la technologie TaqMan ciblant les gènes IS*711*, *bcsp31* et *per*. Les résultats révèlent que la cible IS*711* offre la sensibilité la plus élevée. Les performances de la PCR-TR ont ensuite été évaluées sur une série de prélèvements biologiques d'animaux sains ou malades et comparées avec la méthode de bactériologie. La PCR-TR montre une bonne spécificité pour les 3 gènes cibles mais une sensibilité diagnostique supérieure en faveur de l'IS*711* (Bounaadja et al., 2009).

Trois approches PCR-TR ont été évaluées pour détecter *Brucella abortus*: SYBR Green I (agent intercalant de l'ADN double brin), 5'-exonucléase (fluorophore enzymatique libéré) et des sondes d'hybridation (fluorescence de transfert d'énergie de résonance). Les trois épreuves ont utilisé les mêmes amorces d'amplification pour produire un amplicon identiques. Cet amplicon couvre une région du génome de *B. abortus* qui comprend des parties du gène alkB et l'élément d'insertion IS711. Les trois essais étaient de sensibilité comparable, cependant, la

plus grande spécificité a été réalisée avec la technologie sonde d'hybridation(Newby et al., 2003).
Un nouveau test de PCR-TR a été développé pour la détection rapide et l'identification du genre *Brucella*, ainsi que la différenciation entre les six espèces classiques de *Brucella*. De nouvelles amorces et sondes TaqMan spécifiques pour les 6 espèces de *Brucella* ont été conçus, pour identifier et différencier *Brucella* au niveau de l'espèce.
Le test s'est révélé être hautement spécifique, avec l'avantage d'être approprié pour une utilisation, à la fois, de PCR conventionnelle et en temps réel. En raison de sa grande sensibilité, cette PCR-TR peut être un outil précieux pour la détection et la différenciation des espèces de *Brucella* dans des échantillons cliniques, où, la charge bactérienne est très faible dans la majorité des cas (Hinić et al., 2008).

Quatre PCR en temps réel utilisées pour identifier et différencier *B. suis* au niveau du biovar ont été élaborées, sur la base des amorces et des sondes TaqMan capable de discriminer 4 polymorphismes nucléotidiques simples. Les résultats ont montré que les profils allélіques étaient uniques pour chaque biovar de *B. suis* et les signatures les plus pertinentes ont été déterminées sur une collection de 137 souches de terrain de différentes régions du monde, précédemment caractérisées. L'inconvénient de ce test était que certaines souches de terrain, *B. suis* biovar 3 correspondaient au profil allélique de *B. suis* biovar 1 (Fretin et al., 2008) .
Le choix des prélèvements cliniques pour l'utilisation de la PCR-TR est varié. Ainsi, des PCR-TR ont été décrites à partir de différents échantillons de: sang, sérum, lait et ganglions lymphatiques (Gwida et al., 2011; O'Leary et al., 2006; Tiwari et al., 2014).
L'évaluation de la PCR-TR sur des prélèvements de sang et de sérum bovins suggère que cette technique n'est pas une bonne méthode pour la détection de l'ADN de *Brucella* dans ces prélèvements (O'Leary et al., 2006; Tiwari et al., 2014). Alors que cette méthode semble au contraire, donner une très bonne sensibilité pour détecter *Brucella* dans le sérum camelin (Gwida et al., 2011).

4.2.4 Les PCR multiplex

Plusieurs PCR multiplex ont été décrites pour l'identification des *Brucella* au niveau de l'espèce et en partie au niveau du biovar, utilisant différentes combinaisons d'amorces.

4.2.4.1 AMOS PCR

La première PCR multiplex, appelée AMOS PCR, a permis d'identifier les quatre espèces de *Brucella* (*Brucella abortus, Brucella melitensis, Brucella ovis et Brucella suis*) et a été nommée AMOS PCR pour les premières lettres des noms d'espèces (*Abortus- Melitensis-Ovis-Suis*). Publiée en 1994, elle utilisait cinq amorces pour identifier *Brucella* au niveau de l'espèce. Cette méthode pouvait détecter quatre espèces de *Brucella* et quelques biovars (*B. abortus* biovars 1, 2 et 4, *B. melitensis*, *B. ovis* et *B. suis* biovar 1)(Bricker, 2002; Whatmore, 2009). Plus tard, cette méthode a été améliorée afin de détecter et d'identifier plus de biovars *Brucella* et de différentier les souches vaccinales S19 et RB51. Afin de distinguer les isolats *B.*

abortus souches vaccinales S19 et RB51 de la souche de terrain, trois amorces supplémentaires ont été ajoutés à la PCR AMOS originale. Sur la base de ce format AMOS PCR, une autre amorce a été conçue et ajoutée. Cette AMOS PCR raffinée produit une bande supplémentaire spécifique à *B. abortus* biovars 3b, 5, 6 et 9. Malgré ce progrès, cet essai a encore l'inconvénient de ne pas détecter toutes les espèces ou tous les biovars de certaines espèces (Bricker, 2002; Smirnova et al., 2013; Whatmore, 2009; Yu and Nielsen, 2010).

4.2.4.2 Bruce-ladder

En 2006, une nouvelle PCR multiplex a été développée, appelée: Bruce-ladder ; utilisant huit paires d'amorces dans une réaction unique, cette technique peut identifier et différencier toutes les espèces de *Brucella* ; les six espèces classiques de *Brucella* (*B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. ovis, B. canis et B. neotomae*), ainsi que les *Brucella* marines (*B. ceti et B. pinnipedialis*) et les souches vaccinales *B. abortus* RB51 et S19, et *B. melitensis* Rev 1 (voir fig. 4.7) (García-Yoldi et al., 2006).
Une évaluation de ce test a été réalisée dans sept laboratoires, utilisant 625 souches de *Brucella* de différentes espèces animales et origines géographiques. Ce test robuste pouvait différencier en une seule étape toutes les espèces de *Brucella,* à l'exception de quelques souches de *B. canis* qui ont montré le même profile PCR que *B. suis* (López-Goñi et al., 2008).

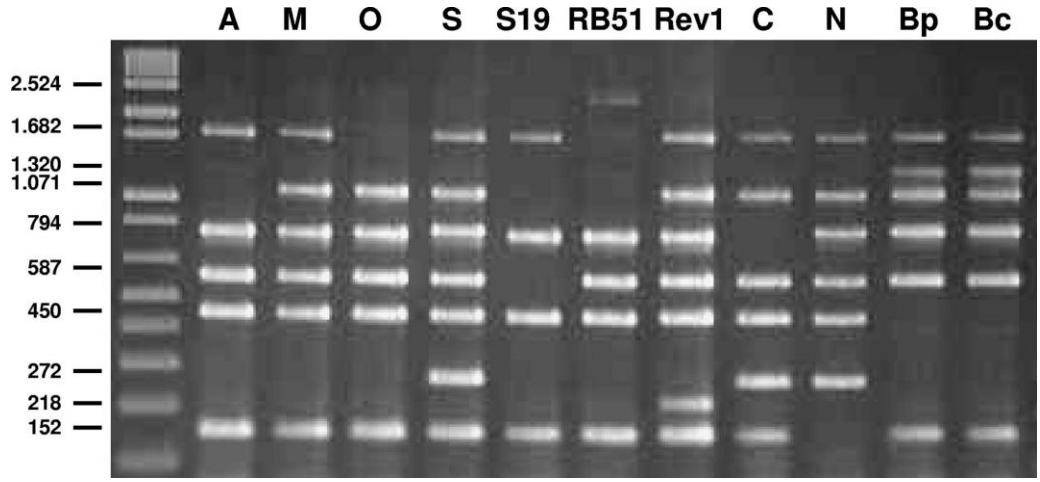


Figure 4.7 : Différenciation de toutes les espèces de *Brucella* et des souches vaccinales par la Bruce-ladder multiplex PCR.

Ligne 1 (A) : *B. abortus*; ligne 2 (M) : *B melitensis;* ligne 3 (O) : *B. ovis*; ligne 4 (S) : *B. suis ;* ligne 5 (S19) : souche vaccinale *B. abortus* S19; ligne 6 (RB51) : souche vaccinale *B. abortus* RB51; ligne 7 (Rev.1) : souche vaccinale *B. melitensis* Rev.1; ligne 8 (C) : *B. canis* ; ligne 9 (N) : *B. neotomae;* ligne 10 (Bp) : *B. pinnipedialis*; ligne 11 (Bc) : *B. ceti* (López-Goñi et al., 2008).

Récemment, cette PCR a été améliorée, pour couvrir les nouvelles espèces de *Brucella* telles que *B. microti* et *B. inopinata* (voir fig. 4.8) (Mayer-Scholl et al., 2010). Bien que la Bruce-

ladder améliorée permet de préciser toutes les espèces existantes, la différenciation au niveau de biovar, n'est pas encore possible (Scholz and Vergnaud, 2013).

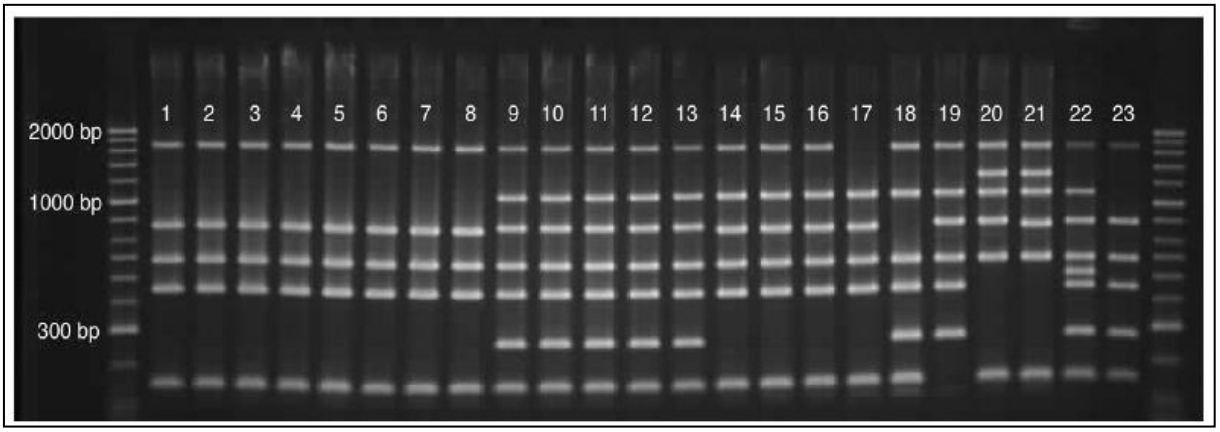


Figure 4.8 : Identification et différentiation de toutes les espèces et biotypes de *Brucella* connues par PCR multiplex modifiée.

Lignes 1-8 : *B. abortus* biotype 1-7 et 9 ; Lignes 9-13 : *B. suis* biotypes 1-5 ; Lignes 14-16 : *B. melitensis* biotype 1-3 ; Ligne17 : *B. ovis* ; Ligne18 : *B. canis* ; Ligne19 : *B. neotomea* ; Ligne20 : *B. pinnipedialis* ; Ligne 21 : *B. ceti* ; Ligne 22 : *B. microti* ; Ligne 23 : *B. inopinata* (Mayer-Scholl et al., 2010).

4.2.4.3 Bruce-ladder suis ou suis-ladder

La suis-ladder est la méthode PCR multiplex la plus récemment développée, qui permet de différencier entre les cinq biovars de *B. suis*. Ce nouveau test de PCR multiplex, rapide et précis, permet l'identification de *B. suis* au niveau du biovar mais aussi la différenciation de *B. suis* et *B. canis* par l'ajout de nouvelles amorces (López-Goñi et al., 2011).

4.2.4.4 RAPD PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA PCR*)

Fekete et *al.* en 1992, étaient les premiers à appliquer cette technologie à *Brucella*. Tcherneva et *al.* ont suivie en 2000. Dans les deux laboratoires, la technique s'est révélée hautement discriminante. En réponse aux préoccupations concernant la reproductibilité, le groupe de Tchernava a méthodiquement examiné les paramètres de dosage pour développer un protocole optimisé. Cependant, l'impact probable de facteurs incontrôlables sur reproductibilité, tels que la performance des équipements et du milieu de l'échantillon, rendent douteux que cette technologie sera largement adopté (Bricker, 2002).
Une nouvelle méthode a été mise en œuvre pour identifier des amorces afin de différencier les *Brucella* au niveau espèces et biovar. Ainsi, 19 amorces ont été utilisées pour développer une PCR multiplex. Cette méthode identifie spécifiquement *B. neotomae, B. pinnipedialis, B. ceti* et *B. microti* ; et différencie *B. abortus* biovars 1, 2, 4 de biovars 3, 5, 6, 9, ainsi qu'entre *B. suis* biovar 1, biovars 3, 4 et biovars 2 et 5. Lors de l'essai, tous les types *Brucella*, les souches de référence et la majorité des 118 souches de terrain examinées, ont pu être identifiées avec

précision par leurs profils de bandes respectives en fonction de leur typage précédent. Les souches de *B. canis* ont été subdivisées en deux groupes, l'un présentant un modèle unique et l'autre un modèle de bandes partagées avec *B. suis* biovar 3 et 4. Ce test PCR est utile pour l'identification rapide des *Brucella* au niveau espèce et biovar (Huber et al., 2009).

4.2.5 RFLP (*Restriction Fraction Length Polymorphisme*)

Une approche commune de typage est l'utilisation de la RFLP appliquée aux gènes de *Brucella* connus pour être polymorphes. Cette approche a été particulièrement appliquée à divers gènes codant pour les protéines de la membrane externe (*omp*), pour la différentiation des espèces de *Brucella* et la description de nouvelles souches. Plusieurs travaux se sont focalisés sur le locus *omp2*. D'autres études ont indiqué la présence de polymorphismes spécifiques aux espèces qui ont été exploitées pour développer des approches PCR-RFLP, pour distinguer les espèces de *Brucella*, à l'exception de *B. abortus* biovars 3, 5, 6 et 9 de certaines souches de *B. melitensis*, et *B. canis* de *B. suis* biovars 3 et 4. D'autres marqueurs spécifiques aux espèces ont été identifiés et testés comme *omp25, omp31, BCSP31*, mais ces méthodes ne différentient pas les espèces ou biovars de Brucella (Bricker, 2002; Whatmore, 2009).
La RFLP sur la base de l'analyse de restriction des gènes codant pour des protéines de la membrane externe de *Brucella* est un outil simple à mettre en œuvre, mais le degré de polymorphisme est faible et la robustesse de ce test reste encore insuffisante (Godfroid et al., 2010).

4.2.6 Les VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) et MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*)

Des séquences répétées en tandem dans l'ADN bactérien présentent une hypervariabilité allélique liée à la variation du nombre de répétitions ou d'ADN de recombinaison entre des séquences répétées homologues. Ces marqueurs sont connus sous le nom de nombre variable de répétitions en tandem (VNTR) et sont considérés comme des horloges moléculaires à grande vitesse. Les programmes basés sur ces marqueurs sont parfois appelés MLVA et ils se sont avérés particulièrement utiles pour la discrimination des espèces bactériennes qui, comme *Brucella*, affichent très peu de diversité génomique (Whatmore, 2009).

4.2.6.1 HOOF-Print *(Hypervariable Octameric Oligonucleotide Fingerprints)*

La première application VNTR pour le typage des *Brucella*, nommé "Hoof-Prints", a été publiée en 2003. Le génome de *Brucella* contient une famille de séquences répétées en tandem. Huit loci très variables, présents dans la plupart des espèces de *Brucella*, ont été sélectionnés pour être utilisé dans ce test. Les variations du nombre de répétitions de chaque locus peuvent être facilement étudiées en amplifiant les régions correspondantes et puis subir une électrophorèse sur gel, de préférence, l'électrophorèse capillaire, étant donné la taille

courte de l'unité de répétition. Cette sélection de répétitions en tandem a un pouvoir discriminant très élevé et peut être utile pour les enquêtes épidémiologiques. Cependant, cette technique ne peut pas discriminer les espèces en raison du niveau élevé d'homoplasie de ces loci (Scholz and Vergnaud, 2013; Whatmore, 2009).
La méthode était capable de discriminer toutes les espèces, biovars et des souches de terrain. Cette méthode est aussi rapide que d'autres méthodes et les résultats étaient reproductibles. Un inconvénient est que aucun allèle spécifique aux espèces ou biovars n'ont été trouvés et il pourrait donc être utilisés seulement après identification par les autres méthodes (Yu and Nielsen, 2010).

4.2.6.2. VNTR-21

Un nouvel essai de typage VNTR pour *Brucella* a été publié. Il comprenait les huit loci originales "Hoof-Prints", ainsi que 13 nouveaux loci VNTR supplémentaire pour donner 21 loci, nommé VNTR-21. Contrairement au projet initial "Hoof-Prints ", cette approche comprend des loci avec une gamme beaucoup plus large de vitesses évolutives. Bien que le test ait conservé l'énorme pouvoir de discrimination de la "Hoof-Prints", identifiant 119 génotypes distincts lorsqu'il est appliqué à une collection mondiale de 121 souches de *Brucella*, il a également fourni une certaine résolution au niveau des espèces, avec des allèles spécifiques aux espèces identifiés à des loci avec une vitesse d'évolution plus lente. L'analyse des clusters a montré qu' à quelques exceptions près, les groupes correspondent aux espèces conventionnelles *B. abortus, B. ovis, B. melitensis* et *B. neotomae* ont été identifiés, ainsi qu'un cluster de *B. suis* avec sous-groupes correspondant aux biovar 2 et biovars 1, 3 et 4. Dans cette analyse, *B. canis* semblait étroitement liée à *B. suis* biovars 1, 3 et 4, tandis que *B. suis* biovar 5 apparaît distinct à la fois des autres biovars de *B. suis* et des autre espèces *Brucella*. Ainsi, l'utilisation des six loci les plus stables s'est révélé être suffisant pour déterminer l'espèce (Whatmore, 2009; Whatmore et al., 2006).

4.2.6.3 MLVA-15

Une autre méthode d'identification basée sur la PCR de *Brucella* comprend une analyse multilocus d'un nombre variable de répétitions en tandem des régions du génome (MLVA). Cette méthode est basée sur la quantification du nombre de répétitions en tandem dans un locus particulier du génome bactérien et est utilisée pour le génotypage des *Brucella*, non seulement au niveau du genre et des espèces, mais aussi du biovars (Smirnova et al., 2013).
Les auteurs ont testé 80 loci répétés en tandem sur 21 souches de référence et ont trouvé des clusters qui correspondent en grande partie aux espèces classiques (fig.4.9). Pour une utilisation pratique, un sous-groupe de 15 loci, qui ont préservé ce regroupement, ont été sélectionnés. Les 15 marqueurs ont été divisés en deux panels. Panel 1 inclus huit marqueurs minisatellites capables d'identifier les espèces. Panel 2 avec sept marqueurs microsatellites a un pouvoir discriminant supérieur. L'application à 236 isolats cliniques a généré des clusters cohérents avec les autres caractéristiques moléculaires et phénotypiques des *Brucella* (Le Fleche et al., 2006).

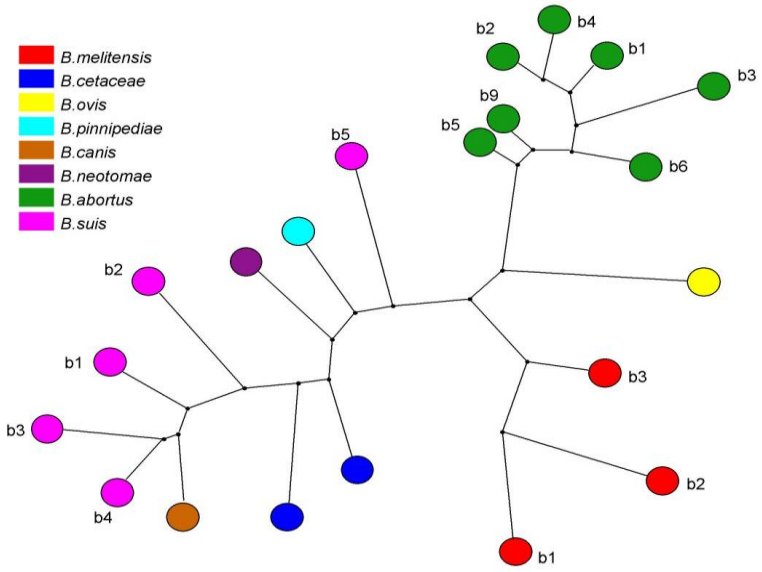


Figure 4.9: Analyse de parsimonie maximale, sur 21 souches de référence utilisant les données des 71 marqueurs. Les différentes espèces sont représentées par différentes couleurs, comme indiqué. Biovars (b) sont mentionnés lorsque cela est pertinent (Le Flèche et al., 2006).

4.2.6.4 MLVA-16

C'est une version légèrement modifiée de MLVA-15, divisée en deux panels : panel 1 comprenant huit marqueurs minisatellites, avec un faible indice discriminatoire, utile pour l'identification des espèces. Le panel 2 composé de huit marqueurs microsatellites complémentaires, montrant un pouvoir discriminant élevé, ces marqueurs ont été divisés en deux groupes : panels 2A et 2B, composés de trois et cinq marqueurs, respectivement. Le groupe 2B contient les marqueurs les plus hautement variables, adaptés pour les enquêtes épidémiologiques, dont certains sont utilisés dans la HOOF-Print.

Les clusters MLVA -16 corrélaient avec l'origine géographique des souches, avec les souches de *Brucella* isolées à partir de différents patients d'un même foyer ou chez le même patient avant la thérapie et après la rechute ont montré génotypes identiques, ou la source d'infection de laboratoire. Des souches de *B. melitensis* sensibles à la fuchsine ont été trouvées dans des groupes étroitement liés, donnant la preuve d'une association entre VNTRs et certaines caractéristiques phénotypiques. Toutefois, la validité des biovars établies par des méthodes microbiologiques classiques ne pouvaient pas être confirmés par les clusters MLVA.

La technique MLVA est rapide, très discriminatoire et reproductible dans les isolats humains de *Brucella*. MLVA peut contribuer de manière significative à l'analyse épidémiologique de retraçage des infections à *Brucella* et de la surveillance et le contrôle de la brucellose humaine (Al Dahouk et al., 2007).

Un dendrogramme MLVA-16 basé sur les données de 1925 isolats est représenté dans la fig. 4.10.

Les MLVA-15 et MLVA-16 sont actuellement les méthodes les plus couramment utilisées, d'après la littérature, probablement en raison de l'existence d'une base de données accessible sur Internet qui contient des données à partir de 1492 isolats MLVA-16 (http://mlva.u-psud.fr) (Scholz and Vergnaud, 2013).

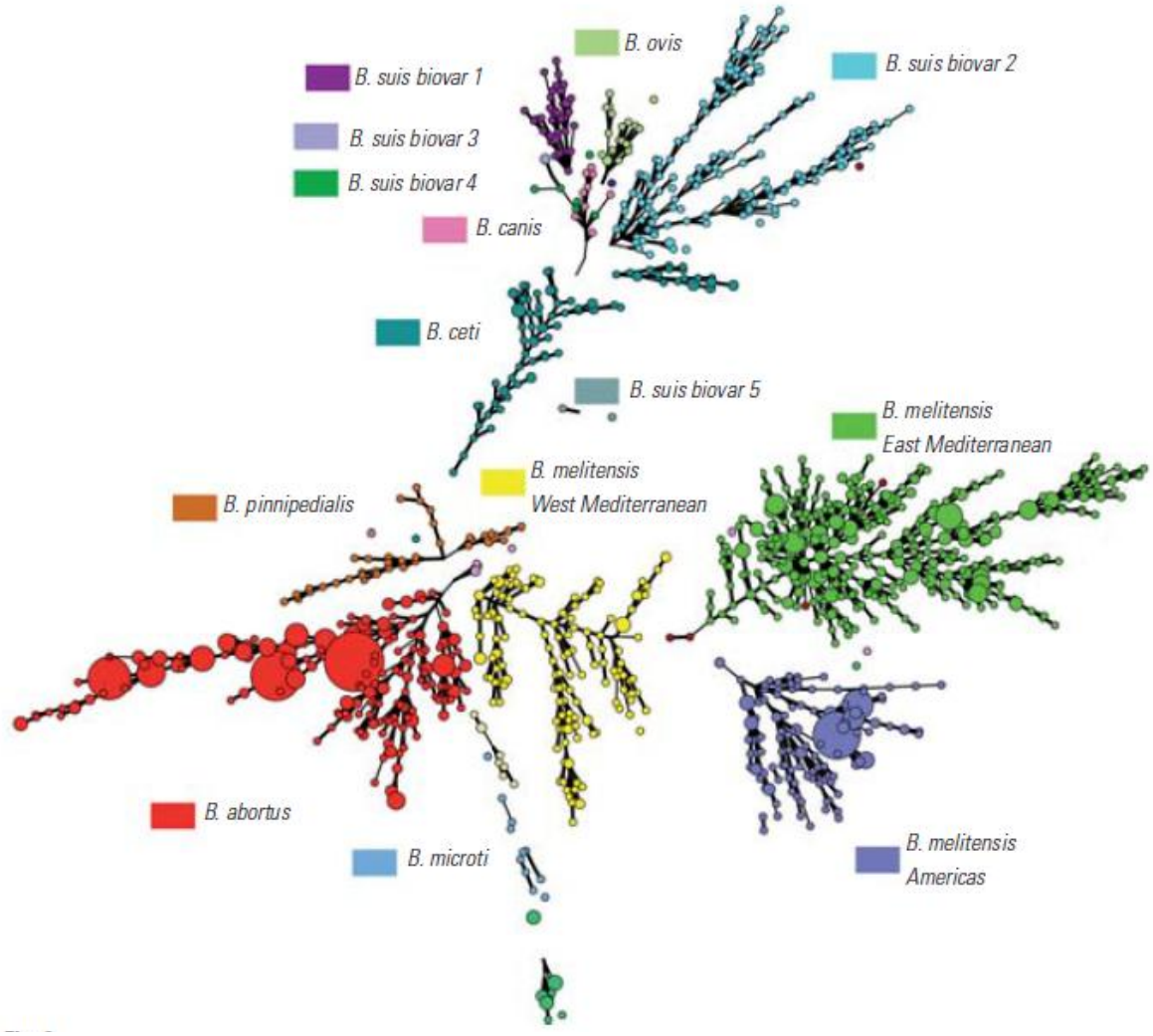


Figure 4.10 : Minimum spanning tree basé sur multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA15Orsay) données à partir de 1925 isolats (Scholz and Vergnaud, 2013).

4.2.6.5 MLST *(MultiLocus Sequence Typing)* ou MLSA *(MultiLocus Sequence Analysis)*

Cette technique détecte des variations de séquence d'ADN dans un ensemble de gènes de ménage et caractérise les souches par leurs profils alléliques uniques (Godfroid et al., 2010).
Le séquençage multilocus est devenue la principale approche pour étudier l'épidémiologie mondiale des bactéries et est aussi fréquemment utilisé pour les études phylogénétiques (Whatmore, 2009). Cette méthode implique le séquençage des fragments d'un nombre de gènes, classiquement des gènes de ménage, qui sont soumis à une sélection, qui sont d'évolution lente et au sein des quels la variation est presque neutre. L'utilisation de multiples fragments de gènes peut donner un pouvoir discriminant élevé, tout en conservant des signatures des évolutions à long terme (Whatmore and Gopaul, 2012). L'approche conventionnelle de la MLST utilise la divergence des séquences dans les gènes de ménage (Scholz and Vergnaud, 2013).
La MLST a été appliquée à *Brucella* pour la première fois en 2007, basée sur neuf loci différents, dont sept correspondent aux gènes de ménage classiques, et les deux restant à l'*omp*25 et à une région intergénique, totalisant 4396 bp de séquences à partir de 160 souches de toutes les espèces et biovars connus à l'époque (Whatmore et al., 2007).
Globalement, l'étude a confirmé l'homogénéité génétique des *Brucella* avec seulement 1,5% de sites polymorphes sur les 160 isolats. Au total, 27 séquences types distinctes ont été identifiés (voir Fig. 4.11). Le dendrogramme résultant de l'étude a montré que les quatre espèces classiques de *Brucella* : *B. abortus, B. melitensis, B. ovis* et *B. neotomae* correspondaient à des groupes bien séparés. A l'exception du biovar 5, les isolats de *B. suis* se regroupent ensemble, bien qu'ils forment un groupe plus diversifié que les autres espèces classiques. Les isolats de *B. canis* sont situés sur la même branche très étroitement liés, mais distincts des isolats de *B. suis* biovar 3 et 4. Les isolats des mammifères marins se regroupaient dans un cluster distinct (Scholz and Vergnaud, 2013; Whatmore et al., 2007; Whatmore, 2009).

Ce premier travail a été récemment étendu à l'étude de 21 loci sur plus de 600 souches, résultant à l'identification de 100 séquences types. L'analyse de ces données maintient la même structure basique mais donne plus de détails à l'échelle sous espèces et plus d'informations dans les relations génétiques entre les biovars de *B. melitensis, B. abortus* et *B. suis* (Whatmore and Gopaul, 2012).
L'un des avantages réels de séquençage multilocus est que, contrairement à d'autres approches antérieures, il indexe les diversités génétiques connues. Plutôt que de fournir simplement un nouveau profil, dont la relation aux profils existants peut ne pas être évidente, il fournit le cadre permettant le positionnement précis de tout génotype nouvellement émergent ou nouvellement découvert. Le séquençage multilocus a joué un rôle dans la description et la caractérisation d'un certain nombre de nouvelles espèces dans le genre *Brucella* (Whatmore and Gopaul, 2012).

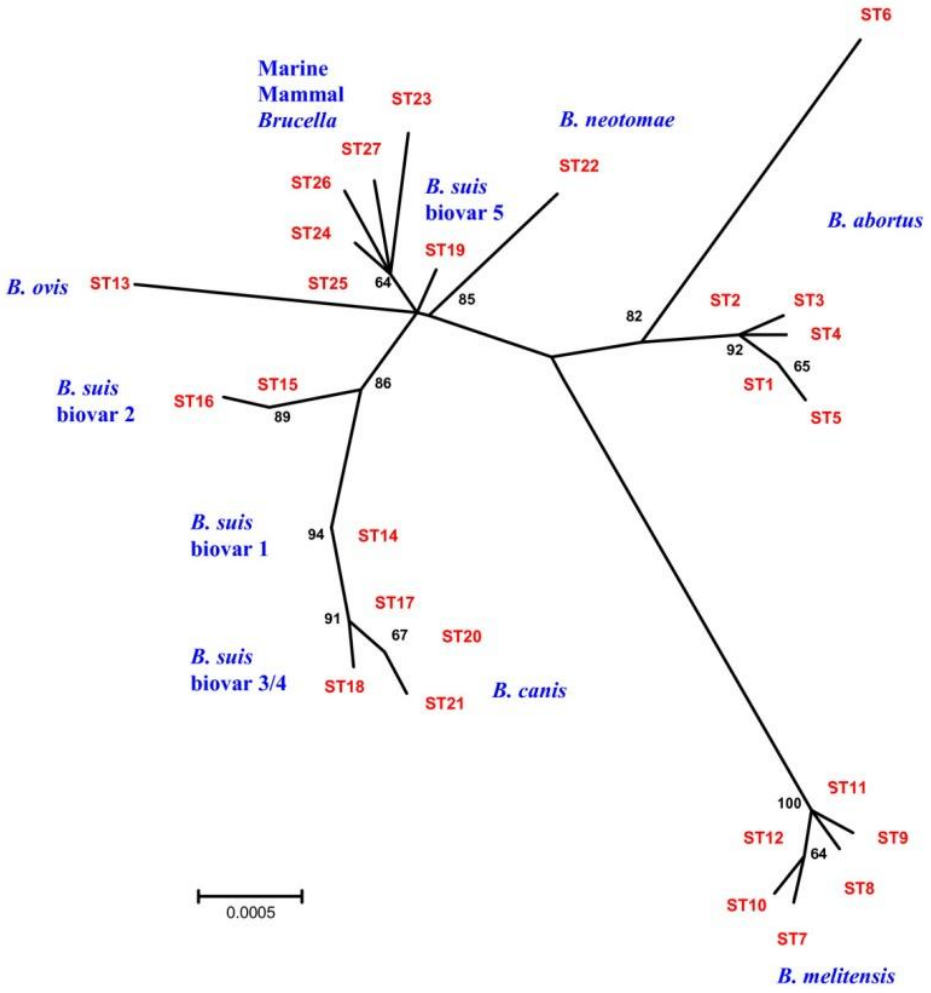


Figure 4.11 : Reconstruction phylogénétique sans racines des relations entre STs (Whatmore et al., 2007)

4.2.5.6 SNP *(single nucleotide polymorphism)*

La technique MLST requiert l'amplification des gènes cibles, suivi par le séquençage double brin de l'ADN et l'analyse ultérieure des séquences. La méthode est coûteuse et prend du temps. Par conséquent, une nouvelle technique rapide a été développée (Scholz and Vergnaud, 2013). L'analyse du polymorphisme nucléotidique simple (SNP) détecte les différences de nucléotides simples dans la séquence d'ADN de membres d'une espèce (Godfroid et al., 2010). Durant les cinq dernières années, plusieurs approches SNP pour typer les *Brucella* ont été décrites. Beaucoup d'entre elles sont basées sur les SNP développées à la suite ou résultant des études de séquençage multilocus (MLST), qui à la différence de ces dernières, sont simples et assez rapide pour le diagnostic de routine. Un certain nombre de tests utilisant ces SNP pour caractériser les isolats à l'échelle de l'espèce ont été décrites, en utilisant des approches telles que l'extension d'amorce, les sondes MGB *(Minor-Groove-Binder)* en PCR temps réel et l'analyse de la courbe de fusion en haute résolution (Whatmore and Gopaul, 2012). La SNP en

PCR temps réel a certains avantages de rapidité et de simplicité technique avec l'avantage que l'amplification et la détection se produisent simultanément plutôt que dans les étapes individuelles (Foster et al., 2008; Gopaul et al., 2008; Whatmore, 2009).

Bien que l'ensemble de ces tests publiés ne comprennent que les espèces classiques et marines, ces tests peuvent facilement être étendues aux nouvelles espèces identifiées (Whatmore and Gopaul, 2012).

Des tests SNP ont été mis au point pour typer les *Brucella* à l'échelle de sous espèce, notamment des analyses SNP pour identifier les biovars de *B. suis* (Fretin et al., 2008)et pour différencier des souches de vaccins vivants (Gopaul et al., 2010).

ETUDE EXPERIMENTALE

Problématique et objectifs de l'étude

La brucellose animale a été mise en évidence bactériologiquement pour la première fois en Algérie, au début du 19ème siècle par les travaux de Sergent et *al.* (1908), qui ont isolé *Micrococcus melitensis* chez les caprins et d'autres animaux domestiques. Depuis, nous ne retrouvons que des études sérologiques menées sur les espèces animales domestiques (bovins, ovins, caprins et camelins) et dans différentes régions d'Algérie, rapportant des taux de prévalences variables. Pour les études bactériologiques, nous retrouvons uniquement deux études : une menée en 1990, par Boudilmi *et al.* dans 6 wilayas de l'Ouest, sur les petits ruminants, rapportant l'isolement et l'identification de *Brucella melitensis* biovar 3. La deuxième menée en 2006, par Aggad *et al.* dans la wilaya de Tiaret sur les bovins, rapporte l'identification de *Brucella melitensis* biovar 3 dans le lait d'une vache.

Les *Brucella* sont rarement recherchées dans les laboratoires de bactériologie. Le laboratoire de Bactériologie Médicale de l'Institut Pasteur d'Algérie est le seul à effectuer cette recherche, uniquement sur des prélèvements humains ; et rapporte l'identification uniquement de *B. melitensis* bv 3 sur toutes les souches humaines des différentes régions du pays.

De ce fait, nous avons très peu de données sur les différentes souches de *Brucella* existantes en Algérie. Toutes les connaissances épidémiologiques acquises sur cette maladie dans notre pays, sont fondées essentiellement sur des enquêtes et dépistages sérologiques. Aujourd'hui les défaillances des tests sérologiques sont bien connues en matière de dépistage de la brucellose. En effet, les réactions faussement négatives rendent la valeur et l'intérêt de l'isolement du germe bien évidents. Par ailleurs, le typage est indispensable pour déterminer la nature, la fréquence et la répartition géographique des biotypes permettant ainsi de préciser la filiation épidémiologique de l'infection brucellique. La connaissance du biotype peut révéler l'existence de marqueurs épidémiologiques. Afin de répondre à cette problématique, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

1. Isoler et identifier par typage phénotypique les souches de *Brucella* responsables de la brucellose bovine en Algérie.
2. Etablir la distribution épidémiologique des espèces et biovars isolés en Algérie.
3. Tester la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques.
4. Détecter les *Brucella* par la méthode PCR en temps réel.
5. Définir les profils génotypiques des souches bovines par la méthode MLVA.
6. Comparer les génotypes des souches bovines aux génotypes des souches humaines isolées en Algérie et au Maghreb.

Pour plus de cohérence, nous avons donc scindé notre étude en deux parties :

- **Partie I :** Caractérisation phénotypique et détection par PCR en temps réel des *Brucella* bovines isolées dans les quatre régions d'Algérie et évaluation de leurs sensibilités aux antibiotiques.

- **Partie II :** Caractérisation moléculaire des *Brucella* bovines et humaines par la méthode MLVA.

PARTIE I

PARTIE I :

Caractérisation phénotypique des *Brucella* bovines, détection par PCR en temps réel et évaluation de leurs sensibilités aux antibiotiques

I. MATERIELS ET METHODES

A. Méthodologie de l'étude

1. Type de l'étude

Notre étude est de type descriptive, unique, multicentrique.

2. Région d'étude

L'étude concerne les quatre régions d'Algérie : Centre, Est, Ouest et Sud, répartie sur 14 wilayas ciblées (fig. 5.1) :

Au Centre : Alger, Blida, Médéa, Tizi Ouzou, Béjaïa, Bordj Bou Arreridj et M'sila.

A l'Est : El-Taref, Annaba et Jijel.

A l'Ouest : Tlemcen et Oran.

Au Sud : Laghouat et Ouargla.

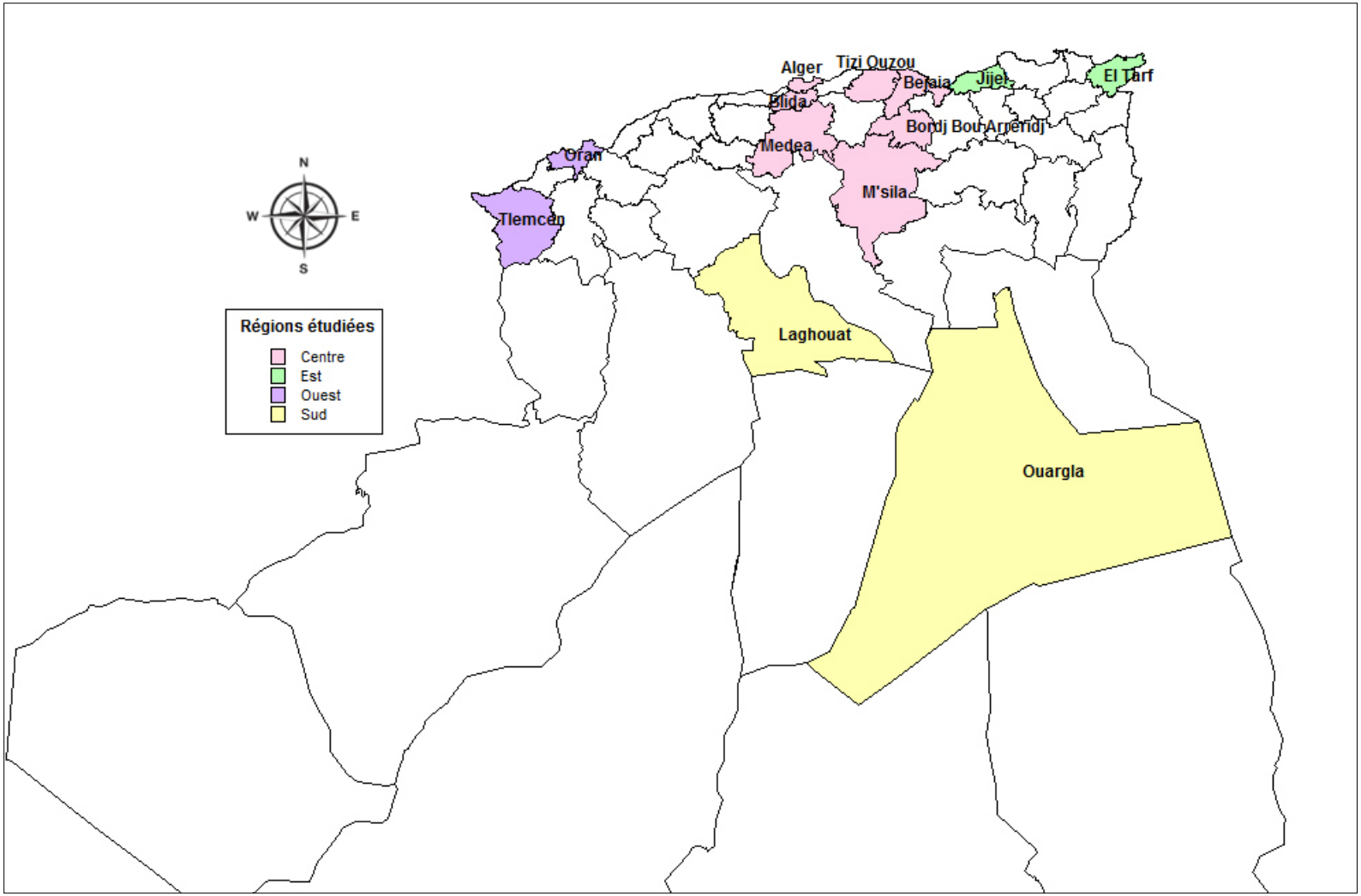


Figure 5.1 : Les wilayas étudiées selon les régions.

3. Population d'étude

- Population cible : les animaux de l'espèce bovine des wilayas étudiées.

- Population d'étude : les bovins séropositifs, détectés par test sérologique, lors du dépistage de la brucellose dans le cadre du programme de lutte dans les wilayas étudiées.

Critères d'inclusion :

- ✓ bovins séropositifs à un ou deux tests sérologiques;
- ✓ bovins détectés séropositifs lors du dépistage de la brucellose ;
- ✓ bovins détectés séropositifs lors d'enquêtes sérologiques (Projet de Fin d'étude (PFE), suspicion de brucellose dans un élevage).
- ✓ animaux séropositifs abattus dans le cadre d'un abattage sanitaire, dans les abattoirs des wilayas étudiées.

4. Période d'étude

L'étude s'est étalée sur la période allant d'octobre 2011 à mai 2014, une durée de deux ans et sept mois (31 mois).

5. Echantillon

L'échantillon doit inclure tous les bovins détectés séropositifs lors du dépistage de la brucellose ainsi que les bovins abattus pour brucellose, dans les wilayas ciblées, durant toute la période d'étude (d'octobre 2011 à mai 2014).

6. Modalité de recrutement

Pour recruter des bovins séropositifs, nous nous sommes basés sur le programme national de lutte contre la brucellose mis en place. En effet, en Algérie, le programme de lutte contre la brucellose bovine est basé sur le dépistage des animaux, puis l'abattage des animaux détectés séropositifs.
Par conséquent, nous avons visé les animaux séropositifs détectés lors du dépistage puis abattus dans le cadre du programme de lutte. Le recrutement de ces animaux devait s'effectuer au niveau des élevages (foyers) et des abattoirs des différentes régions ciblées.

a) Lieux des prélèvements

Nous avons ciblé de prélever, les animaux brucelliques détectés lors du dépistage puis abattus dans le cadre du programme de lutte. Deux lieux ciblés pour récolter les prélèvements :

- **Au niveau des élevages :** dés détection d'un animal séropositif lors du dépistage de la brucellose, les vétérinaires des subdivisions effectuent un prélèvement du vivant de l'animal.

- **Au niveau des abattoirs** : dès l'arrivée d'animaux séropositifs pour un abattage sanitaire, les vétérinaires de l'abattoir effectuent des prélèvements sur animal vivant et /ou après abattage (en ante-mortem et post –mortem).

b) Méthodologie des prélèvements

Pour la collecte des prélèvements d'animaux séropositifs, provenant des différentes régions d'Algérie. Nous avons créé un réseau national vétérinaire, à travers les 4 régions d'Algérie (centre, Est, ouest, sud) ; grâce à une collaboration avec la direction des services vétérinaires (DSV).

i) Création d'un réseau national vétérinaire pour la collecte des prélèvements

La collaboration avec la DSV, nous a permis d'utiliser le réseau des services vétérinaires (fig . 5.2), afin d'impliquer les vétérinaires des différentes régions, quant à la réalisation des prélèvements sur les animaux séropositifs.

- les vétérinaires des subdivisions pour recueillir des prélèvements dans les foyers.
- les vétérinaires des abattoirs pour recueillir des prélèvements lors d'abattage sanitaire.

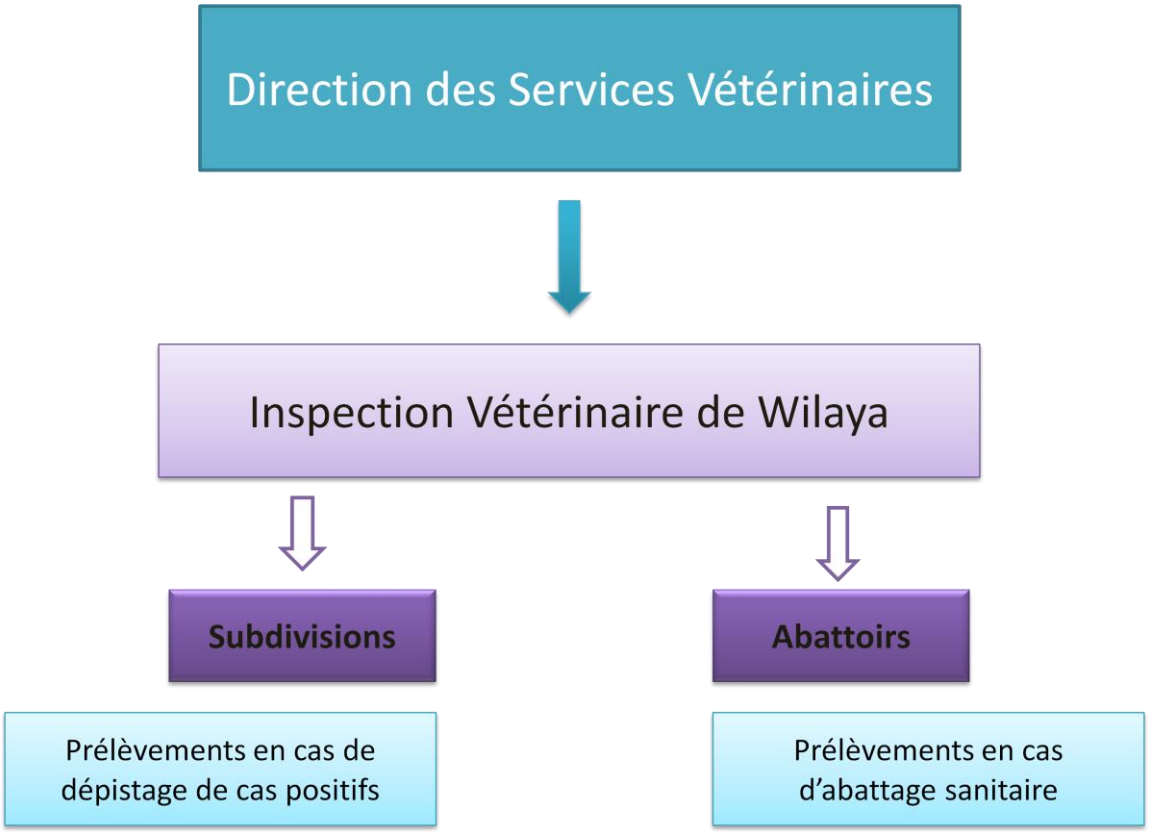


Figure 5.2 : Création du réseau national vétérinaire pour la récolte de prélèvements selon l'organisation des services vétérinaires.

ii) Mise en place du réseau national vétérinaire

En collaboration avec la direction des services vétérinaires, nous avons mis en place le réseau vétérinaire selon les étapes suivantes :

- **Choix des wilayas à cibler**

Nous avons choisi une à trois wilayas à cibler par région, selon la collaboration des inspections vétérinaires :

- **Région Centre** : Alger et Blida.
- **Région Ouest** : Tlemcen.
- **Région Est** : Jijel, Annaba, El Taref.
- **Région Sud** : Laghouat.

- **Rédaction d'un courrier aux inspections vétérinaires de wilaya**

Afin d'impliquer les vétérinaires du terrain à cette étude, un courrier explicatif de la DSV a été établi et adressé aux différentes inspections des wilayas choisies.

Au niveau de chacune des inspections de wilaya, l'information a été transmise aux vétérinaires des différentes subdivisions et abattoirs de la wilaya concernée, pour effectuer des prélèvements en ante-mortem, lors de dépistage d'animaux séropositifs et en post mortem, lors d'abattage sanitaire d'animaux séropositifs.

- **Déplacement vers les wilayas ciblées**

Afin de mettre en route le réseau vétérinaire sur le terrain, nous nous sommes déplacés vers chacune des régions à étudier.
Au niveau de chaque inspection de wilaya et abattoirs ciblés, nous avons:

- présenté aux vétérinaires l'étude et ses objectifs ;
- expliqué le protocole à suivre (méthode pour réalisation, conservation et acheminement des prélèvements) ;
- rédigé un protocole détaillé qui a été remis aux vétérinaires concernés (annexe n° 2);
- fourni le matériel nécessaire pour réaliser les prélèvements, ainsi que les fiches de renseignements (annexe n°1).

iii) Collecte de prélèvements hors réseau

Afin d'avoir un maximum d'animaux séropositifs, et augmenter nos chances d'isoler des souches de *Brucella*, des différentes régions d'Algérie, nous avons :

- **Réalisé des enquêtes sérologiques dans le cadre de projets de fin d'études**

Les bovins détectés positifs ont fait l'objet de prélèvements dans les wilayas de Tizi Ouzou et Médéa.

- **Sollicité l'aide des confrères vétérinaires praticiens dans différentes régions**

Des prélèvements des wilayas d'Oran Bejaia, M'sila, Bordj Bou Arreridj et Ouargla ont été effectués sur des bovins détectés brucelliques au cours de leur exercice quotidien.

7. Types de prélèvements

La technique de recherche par culture des *Brucella* étant peu sensible et les prélèvements renfermant parfois un faible nombre de *Brucella*. Il est donc recommandé de multiplier les prélèvements.
Pour obtenir une sensibilité optimale, nous avons choisi **2 types** de prélèvements, ces derniers sont recommandés par la norme (norme AFNOR: **NF U 47-105**) et privilégiés pour la recherche des *Brucella* :

- **Sur l'animal vivant :** nous avons choisi de prélever du **lait** chez les **femelles**.
- **Sur l'animal abattu :** nous avons choisi de prélever des **nœuds lymphatiques**. Parmi ces derniers, nous avons privilégié :
  - les ganglions de la tête : **ganglions rétro-pharyngiens** chez les deux sexes **;**
  - les ganglions de la sphère génitale **: ganglions rétro-mammaires** chez la femelle.

Chaque animal séropositif étudié devait faire l'objet de **3 types de prélèvements** :

- lait (10 ml),
- ganglions rétro-pharyngiens (02),
- ganglions rétro-mammaires (02).

8. Méthode de prélèvement

a) Le lait

i) Matériel

- Eau ;
- savon de Marseille liquide;
- éponge ;
- chiffon propre ;
- flacons stériles (60 ml) ;
- étiquettes pour identification.
- marqueur indélébile ;
- glacière + accumulateurs.

ii) Technique

- Se laver les mains soigneusement ;
- laver la mamelle avec de l'eau et du savon en insistant sur le sphincter, puis essuyer avec un chiffon propre.
- Eliminer les deux premiers jets et le prélèvement est effectué dans un flacon stérile ;
- prélever tous les quartiers : Le flacon doit contenir le mélange des 4 quartiers, environ 10 à 20 ml ;
- identifier le flacon de prélèvement;
- Se laver et désinfecter les mains entre deux animaux à prélever.

b) Les ganglions lymphatiques

i) Matériels

- Bistouri stériles ;
- flacons stériles (150 ml) ;
- étiquettes pour identification ;
- marqueur indélébile ;
- glacière + accumulateurs.

ii) Technique

- effectuer de manière aseptique avec des instruments stériles ;
- utiliser des bistouris stériles pour ce prélèvement et un soin particulier doit être porté pour éviter la contamination des prélèvements ;
- prélever 02 ganglions rétro-pharyngiens pour les mâles ;
- prélever 02 ganglions rétro-pharyngiens et 02 ganglions rétro-mammaires pour les femelles ;
- placer chaque type de ganglions dans un flacon stérile séparé ;
- identifier chaque prélèvement.

c) Identification des prélèvements

Les prélèvements ont été identifiés sur l'étiquette collée au flacon. Les informations suivantes ont été mentionnées :

- numéro d'identification de l'animal ;
- date du prélèvement (jour/ mois/ année) ;
- sexe de l'animal ;
- type de prélèvement ;
- origine du prélèvement.

d) Transport et conservation des prélèvements

Après la collecte, les prélèvements ont été immédiatement acheminés au laboratoire sous froid, dans une **glacière** (5 ± 3°C) ou **réfrigérés à + 4°C** jusqu'à leur transport.
Les prélèvements qui n'ont pas pu être expédiés dans les 24h, ont été **congelés à -20°C** (essentiellement pour les wilayas éloignées).

Triple emballage : par mesure de sécurité, tous les échantillons ont été conditionnés, selon la norme. Sans conservateur, les prélèvements doivent être mis en triple emballage, c'est à dire le prélèvement est mis dans un flacon stérile, puis tous les flacons de prélèvement doivent être mis dans une boite hermétiquement fermée, cette dernière déposée dans une glacière pour l'acheminement.

Tous les prélèvements collectés des différentes régions devaient être acheminés vers Alger, lieu du laboratoire.
Les prélèvements provenant d'Alger et de Blida, ont été immédiatement ou dans un délai de 24h acheminés au laboratoire.
Les prélèvements récoltés dans les autres wilayas (éloignées de 600 à 800 km), ont été conservés par congélation dans les inspections de wilaya, jusqu'à leur envoi. Des envois réguliers vers Alger, se faisaient par route sous froid (glacière) et regroupaient plusieurs prélèvements.

e) Mesures de sécurité nécessaires pendant le prélèvement

Lors du prélèvement de lait ou des ganglions sur des animaux séropositifs, le manipulateur a pris des précautions particulières. Il a porté des vêtements protecteurs : vêtements imperméables (type combinaison), bottes, lunettes de sécurité, double gants et masque. Puis, il s'est désinfecté les mains à la fin de la manipulation.

f) Fiche de renseignements

Nous avons élaboré une fiche de renseignements concernant l'identité de l'animal prélevé et les signes cliniques qu'il présentait (annexe n°1). Elle a impérativement été remplie en totalité par la personne effectuant le prélèvement et a obligatoirement accompagné l'échantillon.

9. Base de données

Les informations issues des fiches de renseignements ont permis de créer une base de données Excel, contenant des données relatives à tous les animaux étudiés et prélèvements réalisés.

10. Conservation des prélèvements au laboratoire

Au laboratoire, un numéro de série a été attribué à chaque prélèvement.
Si le prélèvement n'est pas analysé dés son arrivée au laboratoire, celui-ci, était soit réfrigéré au maximum 24h, soit conservé par congélation à -20°C.
Les prélèvements étaient divisés en 3 parties : une était destinée à l'analyse bactériologique, une deuxième à l'analyse moléculaire (envoyée en France) et une troisième était conservée.

11. Laboratoires d'accueil

L'analyse des prélèvements récoltés s'est faite en deux parties, avec la collaboration de deux laboratoires d'accueil :

a) Laboratoire de Bactériologie Médicale, Institut Pasteur d'Algérie

Réalisation de la première partie de l'étude qui a consisté à la caractérisation phénotypique des souches de *Brucella* : comprenant dans un premier temps l'isolement et l'identification des *Brucella* sur la totalité des prélèvements récoltés durant l'étude ; et dans un deuxième temps l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Brucella* isolées sur les bovins.

b) Laboratoire National et UE/OIE/FAO de Référence pour la Brucellose Animale (ANSES, France)

Réalisation de la deuxième partie de l'étude qui a consisté au typage moléculaire des souches de *Brucella* isolées en Algérie, qui comprenait :

- La confirmation des souches de *Brucella* isolées en Algérie.
- L'analyse bactériologique des prélèvements retrouvés négatifs en Algérie.
- Détection du genre *Brucella* par PCR en temps réel.
- Le typage moléculaire des *Brucella* isolées en Algérie par la méthode MLVA.
- Le typage moléculaire des *Brucella* humaines d'origine algérienne de la collection du laboratoire de référence, par la méthode MLVA.

Vu le coût onéreux des envois des souches et prélèvements de l'Algérie vers la France, nous n'avons pu effectuer que deux envois qui contenaient donc la moitié des souches isolées et des prélèvements collectés.

12. Envoi des souches et prélèvements de l'Algérie vers la France

Après les analyses bactériologiques des prélèvements effectués en Algérie. Les souches isolées et les prélèvements collectés en Algérie, ont été expédiés en France, vers le laboratoire de référence, pour la confirmation du typage et l'analyse moléculaire.
Vu le caractère dangereux des *Brucella*, les envois ont été effectués selon la réglementation en vigueur, **UN 2814** (Substance infectieuse, affecte les humains). Selon t**rois niveaux d'exigences réglementaires :**

- Triple emballage **agréé** et étiquetage réglementaire ;
- Document d'expédition formalisé et autorisations (autorisation d'exportation pour l'expéditeur, autorisation d'importation pour le destinataire, formalités douanières …);
- Conditions d'acheminement.

Les procédures administratives des envois des colis pouvaient prendre un temps de 6 mois pour que les échantillons arrivent à destination.

13. Analyse statistique

- Les pourcentages ont été calculés avec leurs intervalles de confiance à 95%.
- Les tests de X^2 et de Fisher exact ont été réalisés pour comparer les résultats.

14. Cartographie

Nous avons utilisé un logiciel de cartographie pour la création des cartes épidémiologiques : MapInfo professional , version 6.5.

B. Caractérisation phénotypique des *Brucella*

Pour l'isolement et l'identification phénotypique des *Brucella*, nous avons suivi la norme française AFNOR : **NF U 47-105**, qui décrit la technique de recherche et d'identification bactériologique des bactéries du genre *Brucella*, dans les prélèvements d'animaux.
La technique de recherche utilisée est une technique d'isolement sur milieu gélosé solide. Les techniques d'identification décrites permettent une identification présomptive des bactéries du genre *Brucella*.
L'identification complète de l'espèce et du biovar de *Brucella* est permise par la mise en évidence sur la souche isolée de caractères culturaux, morphologiques, biochimiques, sérologiques et lysotypiques associés.

Cette partie a été réalisée au niveau du laboratoire de Bactériologie Médicale à l'Institut Pasteur d'Algérie.

1. Isolement des *Brucella*

a) Matériel

i) Équipement de protection individuelle

Vu le caractère très dangereux de la manipulation des *Brucella* et le risque de contamination, le manipulateur doit être muni des équipements de protection suivant (fig. 5.1) :

- Combinaison ;
- charlotte ;
- sur-chaussures ;
- masque FPP2 ;
- lunette de protection ;
- 1ère paire de gant en nitrile ;
- 2ème paire de gant en latex à changer en cours de manipulation.

ii) Matériel de laboratoire

- Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) TYPE II ou hotte à flux laminaire ;
- centrifugeuse ;
- réfrigérateur et congélateur ;
- microscope optique;
- pipet-aid ;
- collecteur de pipettes ;
- sac adhésif pour déchets ;
- Benchkote
- désinfectant ;
- plateaux en aluminium jetables;
- Portoirs pour tubes ;
- Falcon stériles de 15 ml ;

- tubes stériles ;
- cryotubes de 2ml ;
- boites de Petri ;
- boîtes de Petri de diamètre 14 cm ;
- lames porte-objet ;
- oeses stériles à usage unique;
- étaleurs stériles à usage unique;
- pipettes graduées stériles à filtre à usage unique ;
- bistouris stériles jetables ;
- pinces stériles jetables ;
- écouvillons stériles ;
- papier aluminium ;
- papier essuie tout ;
- marqueur ;

Figure 5.1 : Equipement de protection individuelle

Figure 5.2 : manipulation des *Brucella* sous PSM

iii) Milieu d'isolement

Pour l'isolement des *Brucella*, nous avons utilisé **le milieu gélosé solide sélectif de Farrell**, préparé par l'ajout de 6 antibiotiques au milieu de base BAB2 et enrichi avec du sérum de cheval stérile (cf. annexe composition du milieu de Farrell).

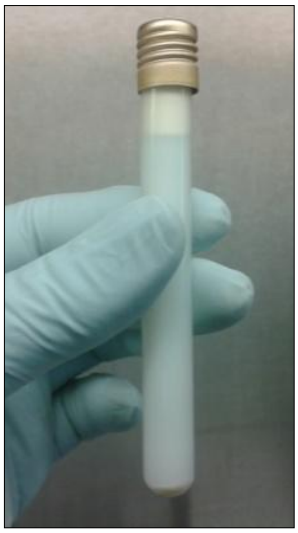
b) Ensemencement

La technique de recherche par culture des *Brucella* étant peu sensible et les prélèvements renfermant parfois un faible nombre de *Brucella*. Il est recommandé de multiplier les ensemencements pour chaque type de prélèvement mis en culture.

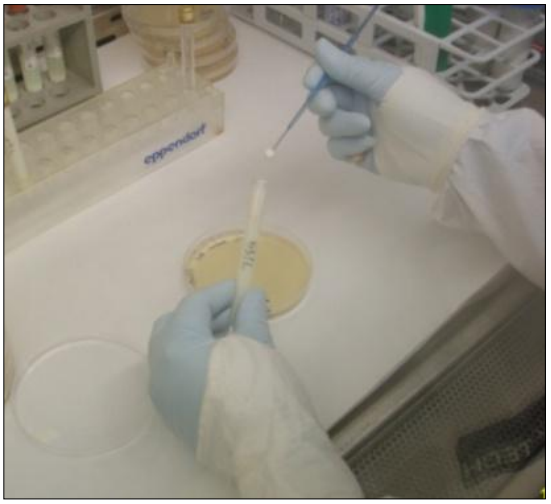
Certaines souches de *Brucella* nécessitent pour leur croissance une atmosphère enrichie en CO_2. Nous avons ensemencé, dans tous les cas, au moins 4 boites de Petri par type de prélèvement, 2 destinées à une incubation en atmosphère normale et les 2 autres à une incubation en atmosphère renfermant 5 à 10 % de CO_2.

i) Isolement des *Brucella* à partir du lait

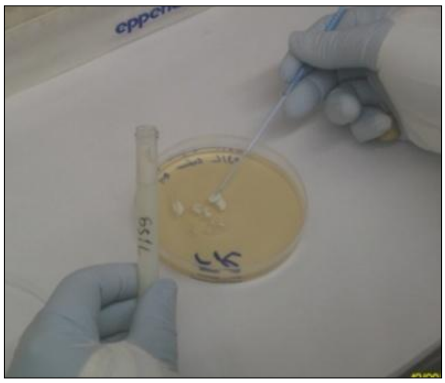
Pour chaque prélèvement, nous avons utilisé environ 10 ml de lait. Le lait est centrifugé entre 1000 à 2000 g pendant 15 min.
La crème et le culot de centrifugation sont prélevés puis déposés et étalés l'un et l'autre directement à la surface du milieu solide de Farrell, à raison de 0,1 à 0,2 ml par boîte (fig 5.3).
Nous avons ensemencé 4 boîtes de Petri de ce milieu, dont 2 ont été mises en ambiance air et 2 en ambiance CO_2 (4 boites pour la crème et 4 boites pour le culot).



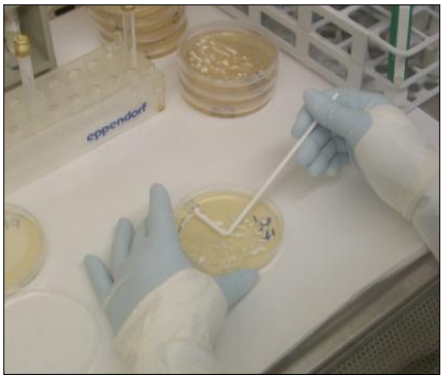
a. Formation de culot et crème après centrifugation



b. Prélèvement de crème

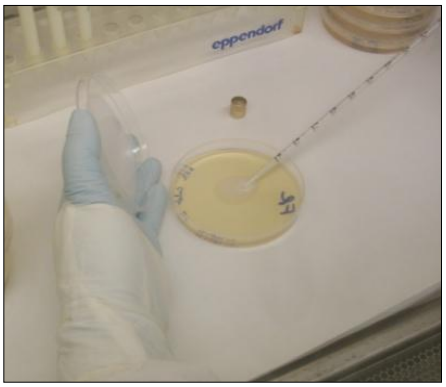


c. Encemensement de la crème sur la gélose

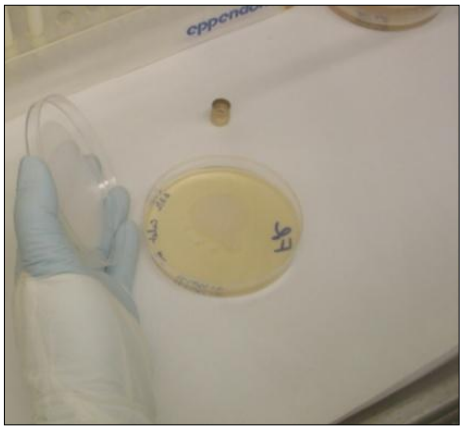


d. Étalement de la crème sur la surface gélosée

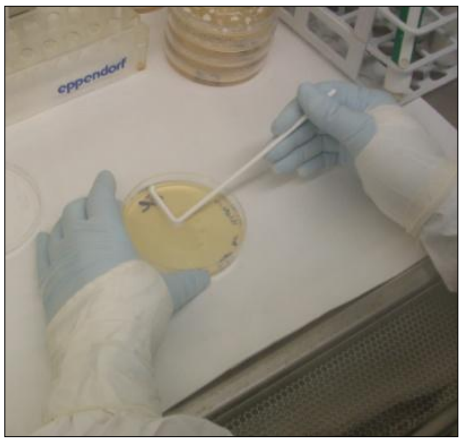
e. Récupération du culot



f. Encemensement du culot sur la gélose



g. Dépôt de 200 µl de culot

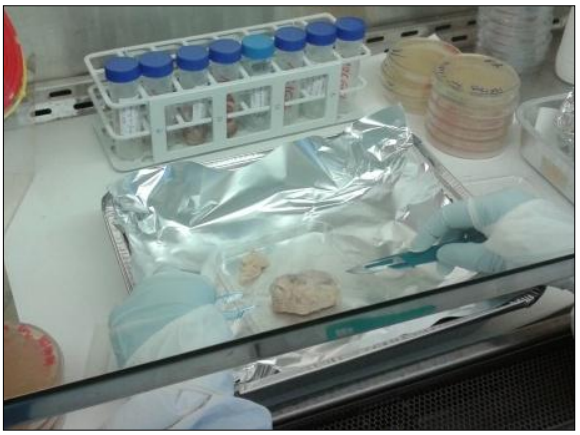


h. Etalement du culot sur la surface gélosée

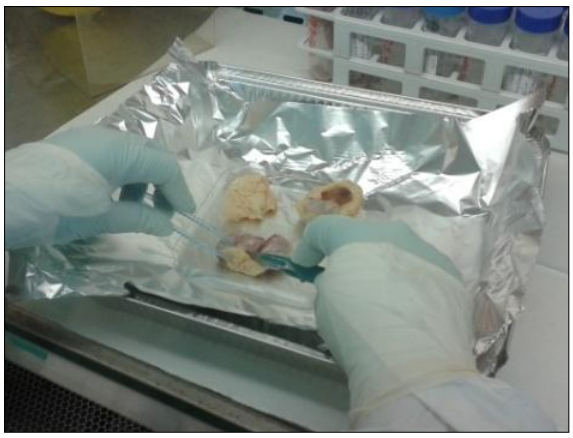
Figures 5.3 : Technique d'isolement des *Brucella* à partir du lait.

ii) Isolement des *Brucella* à partir des ganglions

A l'aide d'un bistouri et d'une pince stériles, le ganglion est dégraissé puis coupé en deux. Nous ensemençons la surface du milieu solide de Farrell avec la moitié du ganglion (nous nous ne disposions pas de stomacher pour broyer les tissus).



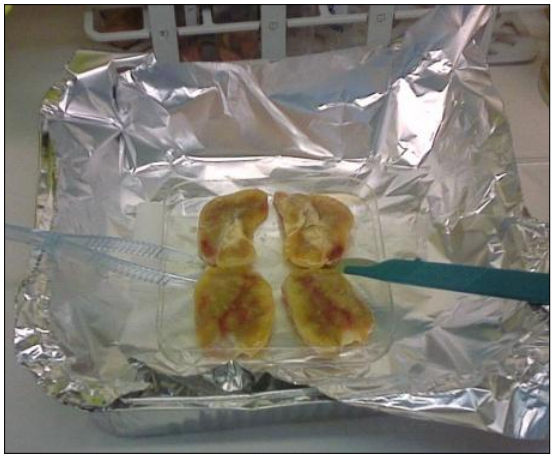
a. Prélèvements de ganglions



b. Dégraissage des ganglions

c. Ganglions dégraissés

d. Coupe des ganglions en deux



e. Ganglions coupés en deux

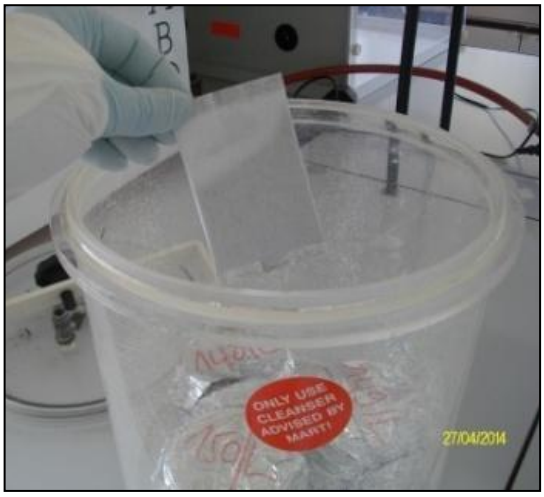
f. Ensemencement sur la surface gélosée

Figure 5.2 : Technique d'isolement des *Brucella* à partir des ganglions lymphatiques.

Nous utilisons 4 boîtes de Petri de ce milieu, dont 2 à mettre en ambiance air et 2 en ambiance CO_2.

c) Incubation

Nous avons incubé les boites à (37 ± 2)°C, une moitié en atmosphère normale, l'autre moitié en atmosphère renfermant 5 à 10 % de CO_2, pendant 10 jours. Nous avons examiné les boites régulièrement jusqu'au 10ème jour d'incubation.



(a)

(b)

(c)

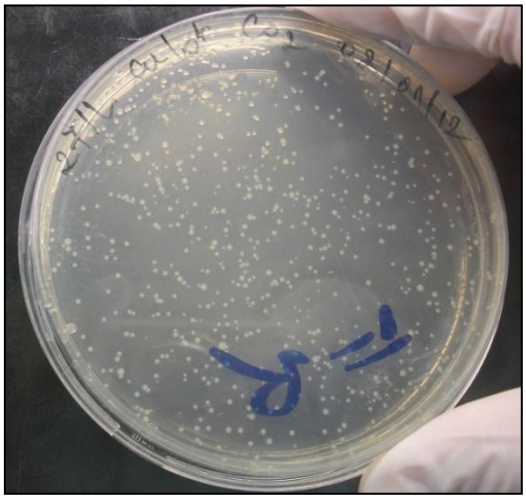
Figure 5.3 : (a, b) Incubation des boites en atmosphère renfermant 5 à 10 % de CO_2
(c) Incubation des boites en atmosphère air et CO_2 dans une étuve à 35°C

d) Lecture (Fig. 5.4)

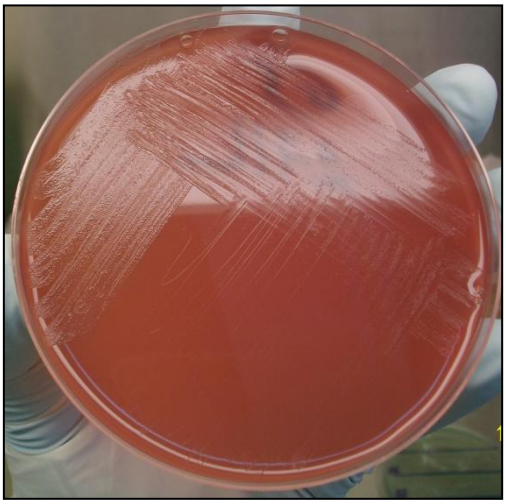
- 1ère lecture à 24 h : observation d'éventuelles cultures autres que *Brucella*.
- 2ème lecture à 72 h : observation de colonies suspectes d'être des *Brucella.*
- 3ème lecture entre 4 et 6 j : observation de colonies suspectes d'être des *Brucella.*
- 4ème lecture entre 8 et 10 j : dans le cas où il n'y a pas de colonies suspectes visibles les jours précédents.

Nous observons à l'œil nu puis (Fig. 5.4) nous repiquons les colonies suspectes (morphologie évoquant celle des *Brucella*), sur milieu solide gélosé non sélectif, et nous avons incubé à 37°C pendant 3 à 6j. Une lecture est faite à 24h, 72h, à 4-6j. On procède ensuite à l'identification du genre des colonies suspectes.

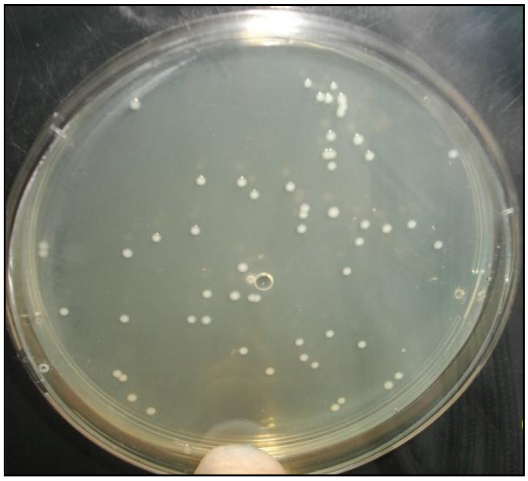
Les colonies de *Brucella* n'atteignent pas une taille permettant leur observation avant le 3ème ou le 5ème jour d'incubation. Une recherche minutieuse doit être effectuée, car il est fréquent qu'une boîte ne contienne qu'une seule colonie de *Brucella*. Lorsqu'on observe par transparence les boîtes entre 3 et 5 jours devant une source de lumière de préférence naturelle, les colonies apparaissent translucides, d'un jaune pâle ambré, à bords lisses et réguliers et d'un diamètre d'environ 0,5 mm à 1 mm. Vues de dessus, elles sont convexes et blanc nacré. Plus tard, elles grossissent et jaunissent mais restent translucides (AFNOR U47-105).



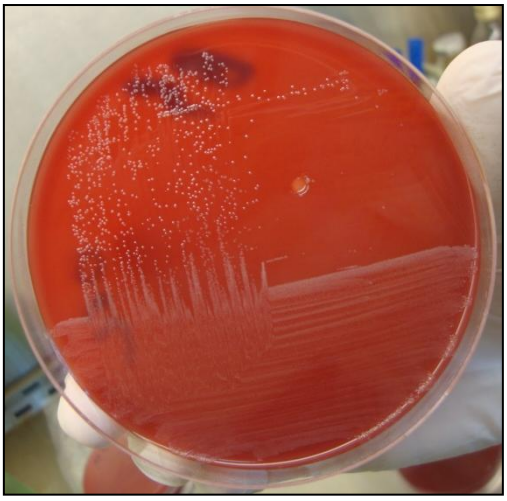
(a) Colonies de *B. melitensis* 3 sur milieu Farrell



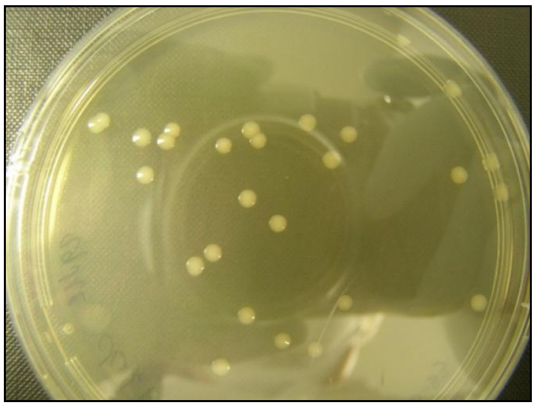
(b) Colonies de *B. melitensis* 3 sur gélose au sang



(c) Colonies de *B. abortus* 3 sur milieu Farrell



(d) Colonies de *B. abotus* 3 sur gélose au sang



(e) Colonies de *Brucella* sp. sur milieu Farrell

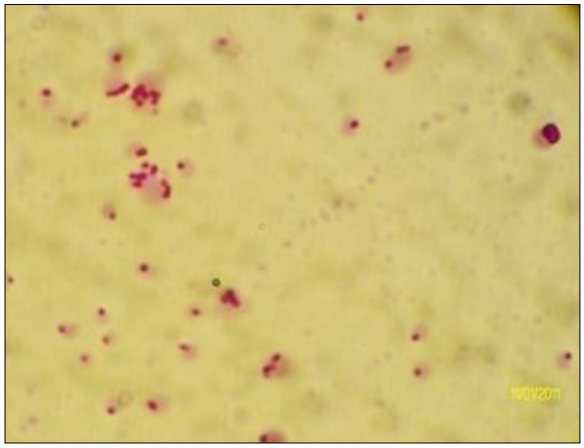
(f) Colonies de *Brucella* sp. sur gélose au sang

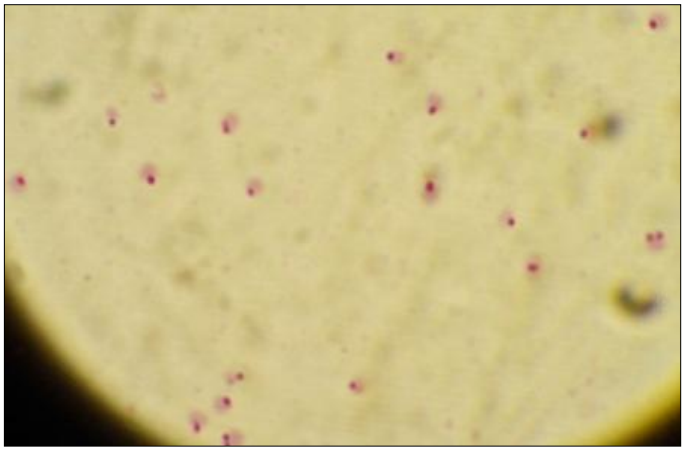
Figures 5.4: Colonies de *Brucella*

2. Identification du genre *Brucella*

a) Coloration de Gram

Nous préparons une suspension bactérienne d'une concentration inférieure à 10^9 UFC/ml, en ensemençant une œse peu chargée dans 4 ml du milieu PBS. Puis, nous étalons une goutte de cette suspension sur une lame ; nous laissons sécher ; et procédons aux étapes classiques de la coloration de Gram.
Observation : On observe des bactéries gram négatif, sous forme de petits coccobacilles (Fig. 5.5).





(a) Brucella suis

(b) Brucella abortus bv 3

Figures 5.5 : Coloration de Gram de *Brucella* (x 100).

b) Coloration au cristal violet

Cette coloration permet de différencier les colonies lisses " S" des colonies rugueuses "R" de *Brucella*.
Nous préparons la dilution finale du colorant ; par dilution de 250 µl de cristal violet (solution mère) dans 10 ml d'eau pure (dilution à 1/40). Puis, nous inondons avec 4 à 5 ml de colorant la boîte de Petri qui contient les colonies isolées de *Brucella* sur milieu TSA ; nous récupérons le colorant à l'aide d'une pipette graduée.

- Les colonies S apparaissent de couleur blanche.
- Les colonies R apparaissent de couleur violet.
- La distinction des colonies S, permet le repiquage des colonies bien caractérisées en phase S.

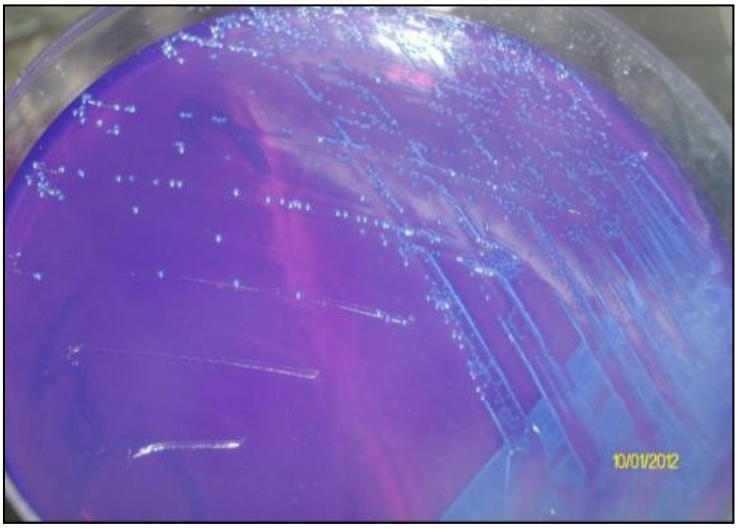


Figure 5.6: colonies lisses "S" de *Brucella* colorées par l'épreuve de cristal violet.

c) Epreuve de l'oxydase

Nous avons utilisé des disques oxydases imprégnés de sel de N, N-Diméthyle-p-phényle-enediamine hémoxalate.
A l'aide d'une oese, nous prélevons une petite quantité d'une colonie suspecte et déposons sur le disque.

Test positif : le papier se colore instantanément en rose violacé.

Test Négatif : couleur inchangée.

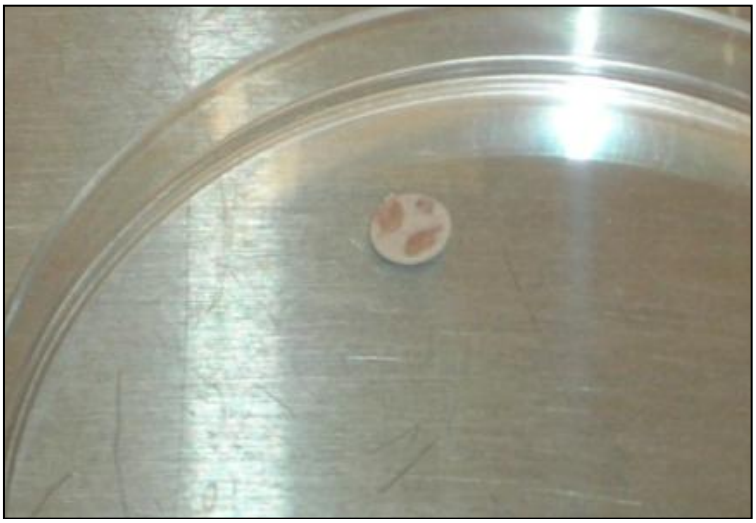


Figure 5. 7: Test oxydase positif sur un disque oxydase

d) Epreuve de l'uréase

Le milieu utilisé pour ce test est le **milieu de Christensen** : c'est un milieu gélosé composé d'urée et de Bacto- agar.
A l'aide d'une œse, nous prélevons une partie d'une colonie suspecte et la déposons sur la gélose, puis laissons à température ambiante, nous observons la boite à intervalles réguliers ;

Test positif : le milieu gélosé vire au rose.

Test négatif : couleur inchangée du milieu.

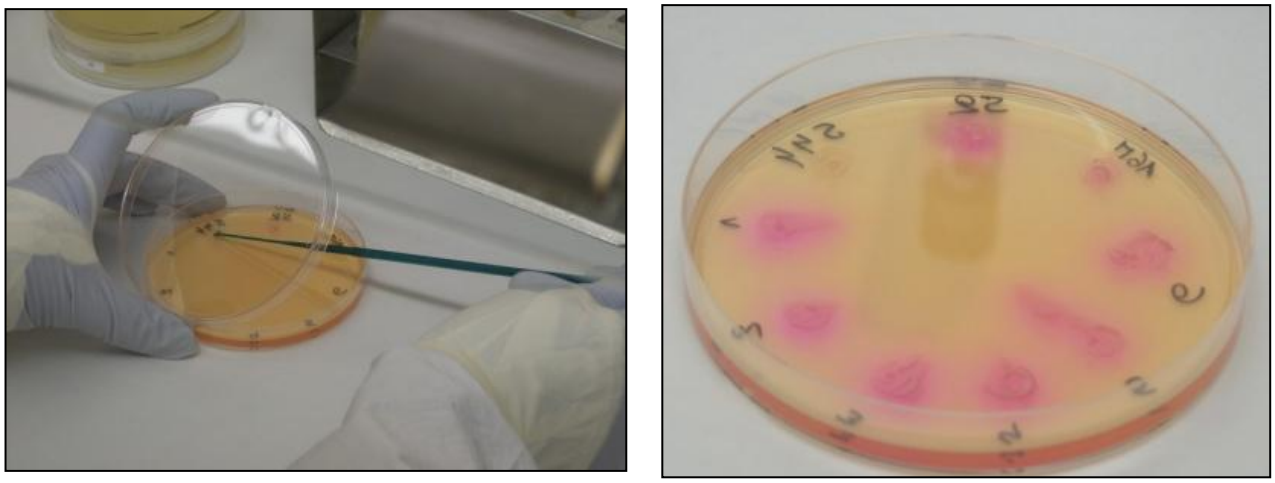


Figure 5.8: test uréase sur milieu de Christensen

e) Epreuve d'agglutination des sérums monospécifiques

Ce test permet de déterminer l'agglutination de la souche par les sérums monospécifiques.
Utilisation des sérums :

- Sérum anti – A
- Sérum anti – M
- Sérum anti – R
- Sérum négatif (sérum de lapin)

Nous plaçons une lame porte-objet dans une boîte de Petri, et déposons 10 µl de chaque sérum, nous testons les 3 monosérums et le sérum négatif ; puis prélevons une à trois colonies suspectes et émulsionnons avec la goutte de sérum ;

Test positif : observation immédiate d'agglutinats.

Test négatif : absence d'agglutinats.

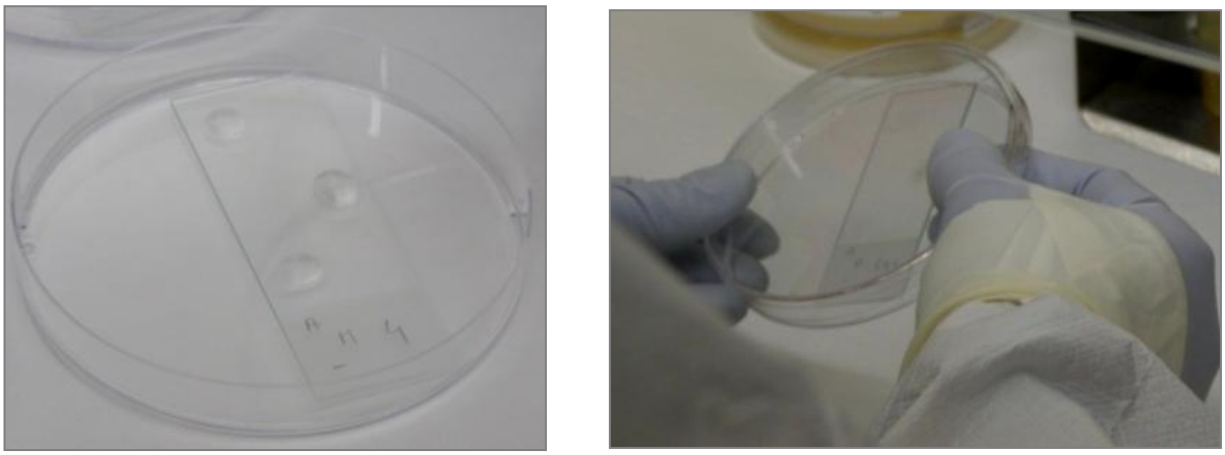


Figure 5.9: Test des sérums monospécifiques.

3. Biotypage des *Brucella*

Pour le typage de l'espèce et du biovar de *Brucella*, nous avons suivi un protocole selon :
- la norme **AFNOR NF U 47-105** ;
- le **Manuel de l'OIE** (*http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf*)

a) Recherche de la CO_2-dépendance

Depuis l'isolement de la souche jusqu'à son identification, nous avons systématiquement incubé les boites en air et en atmosphère renfermant 5 à 10 % de CO_2. Les souches exigeantes en CO_2 ne poussent que dans les boites incubées en atmosphère renfermant du CO_2. Les souches qui n'exigent pas la présence de CO_2 poussent dans les boites incubées dans les deux ambiances.

b) Recherche de la production d'H_2S

Nous avons ensemencé en stries la pente du milieu BAB2, et avons déposé avec une pince stérile une bande de papier filtre imbibé d'acétate de plomb en haut du tube (Fig. 5.10).
Nous avons ensuite incubé un tube en air et un tube en CO_2, à 37±2°C pendant 18 à 30h.

Test positif ***:*** le bord du papier d'acétate de plomb prend une couleur noir.

Test négatif : le papier d'acétate de plomb reste inchangé (Fig. 5.10).

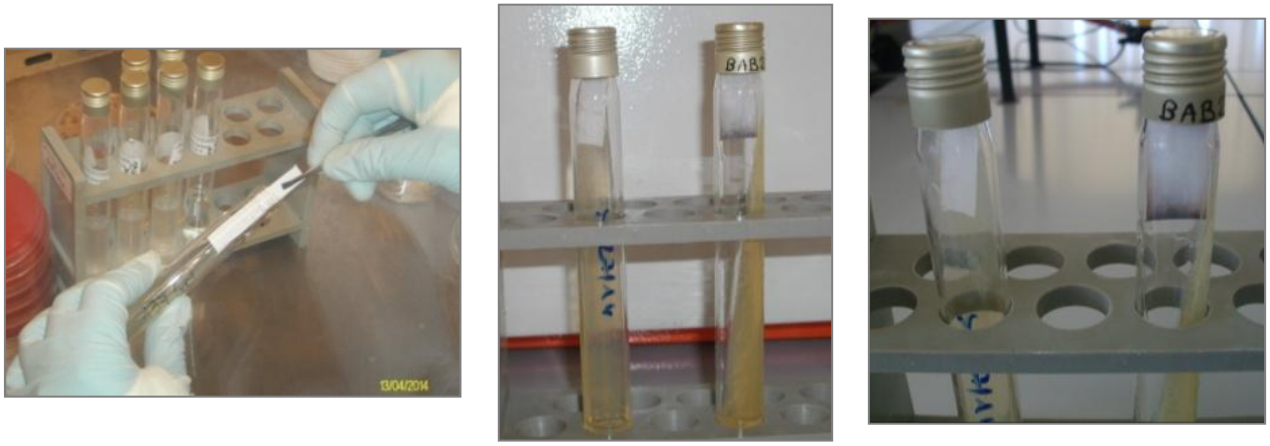


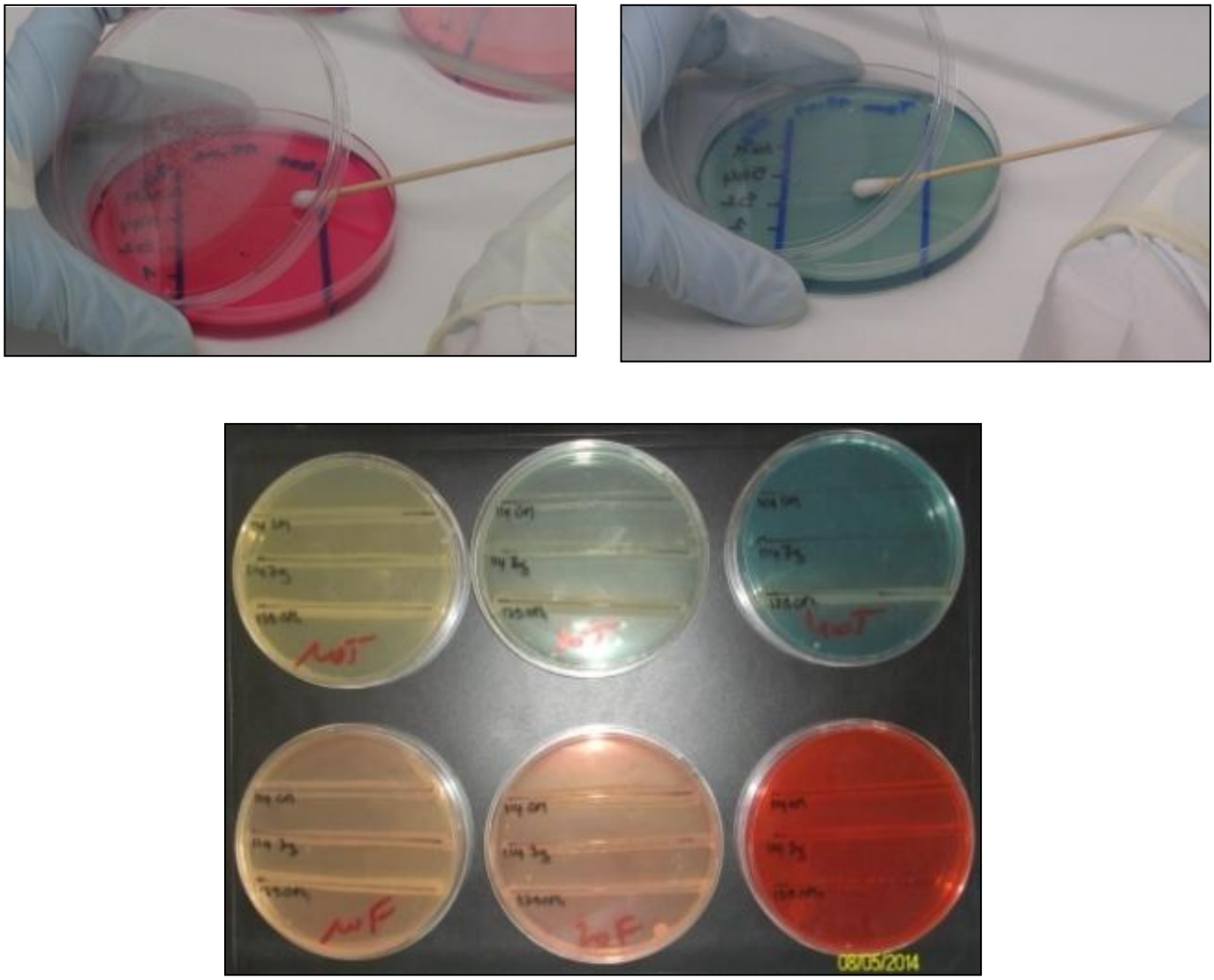
Figure 5.10: test de la production d'H_2S

c) Sensibilité aux colorants, thionine et fuchsine basique

Nous utilisons:

- Milieu BS coloré de thionine à 10 µg/ml.
- Milieu BS coloré de thionine à 20 µg/ml.
- Milieu BS coloré de fuchsine basique à 10 µg/ml.
- Milieu BS coloré de fuchsine basique à 20 µg/ml.

*Milieu BS: est un milieu BAB2 additionné de sérum de cheval stérile.
A partir d'une culture de 48 à 72 h, nous ensemençons 1 ml d'eau physiologique (une solution à 0,9 % de de NaCl), pour obtenir une suspension de 10^9 UFC/ml de la souche à typer .
Avec un écouvillon imbibé de la suspension, nous avons réalisé une strie horizontale pour chacune des souches dans les boîtes des différents colorants à différentes concentrations (Fig.5.11) .
Nous avons ensuite incubé les boîtes à 37±2°C pendant 5 à 6 j, en atmosphère CO_2 uniquement.
Nous avons observé la présence ou l'absence de croissance bactérienne dans chacune des atmosphères et des concentrations (Fig.5.11).



Figures 5.11: Test de sensibilité aux colorants.

d) Lysotypie

Les phages utilisés sont :

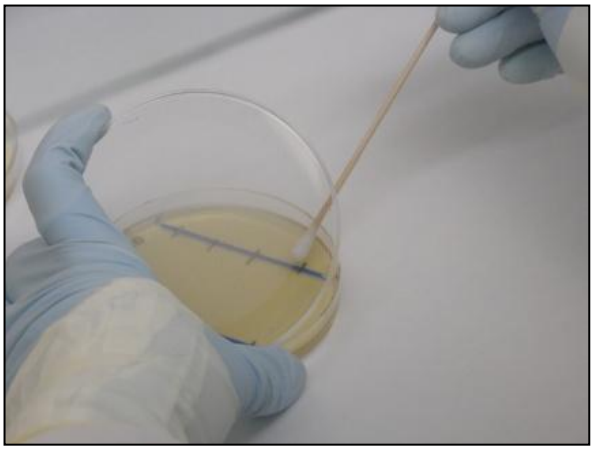
- Tbilisi (Tb)
- Weybridge (Wb)
- Izatnagar$_1$ (Iz$_1$)
- R/C

A partir d'une culture de 48 à 72 h, nous ensemençons 1 ml d'eau physiologique pour obtenir une suspension de 10^9 UFC/ml de la souche à typer. Avec un écouvillon imbibé de la suspension, nous réalisons une strie horizontale pour chacune des souches (Fig.5.12 a); puis nous déposons en quinconce une goutte de 10µl du phage à tester simultanément sur chacune

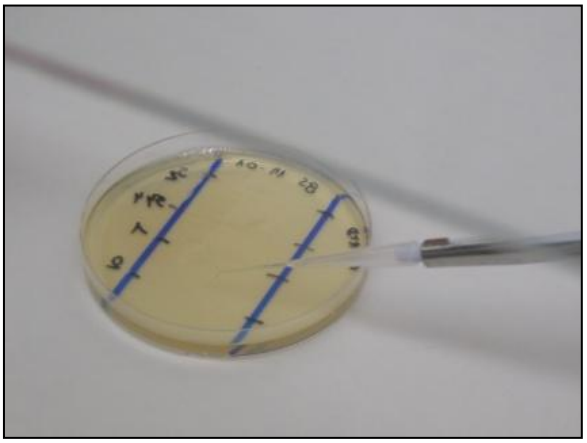
des stries (Fig.5.12 b). Ensuite, nous incubons à 37°C pendant 18 à 30 h, en atmosphère CO_2 uniquement.
1ère lecture : nous examinons les boîtes entre 18 à 30h d'incubation. En cas de lecture difficile, une 2nde lecture peut être effectuée après une nuit supplémentaire à 4°C. Les résultats qui peuvent être observés sont les suivants :

- Lyse totale : absence totale de croissance bactérienne au niveau de la goutte de phage.
- Lyse partielle : faible croissance de culture au niveau de la goutte de phage.
- Absence de lyse : strie de culture homogène.

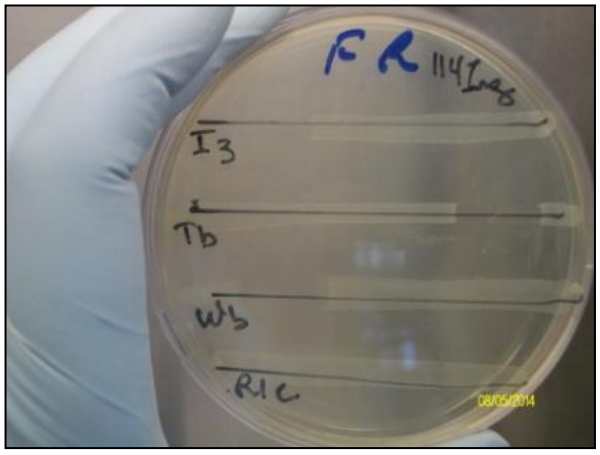
Pour les souches à croissance lente, les boîtes de Petri sont remises à incuber et lues une seconde fois (Fig.5.12 c)**.**

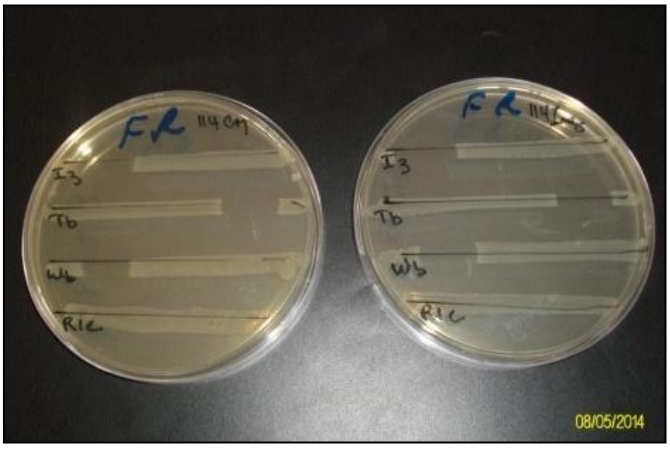


(a) Encemencement en strie



(b) une goutte de 10µl du phage





(c) Lyse totale au niveau de la goutte des phages Iz, Tb et Wb, absence de lyse au niveau du phage R/C.

Figures 5.12: test de lysotypie

4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Pour l'étude de la sensibilité des *Brucella* isolées aux antibiotiques, nous avons utilisé la méthode **E-test** décrite dans le manuel de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (édition 2011).

a) E-test

C'est une technique de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), validée pour les bactéries non exigeantes et pour un certain nombre de bactéries exigeantes.

b) Milieu utilisé

Pour la recherche de la sensibilité aux antibiotiques, nous avons utilisé le milieu solide gélosé de **Mueller-Hinton additionné de sang de cheval cuit**.

c) Les antibiotiques testés

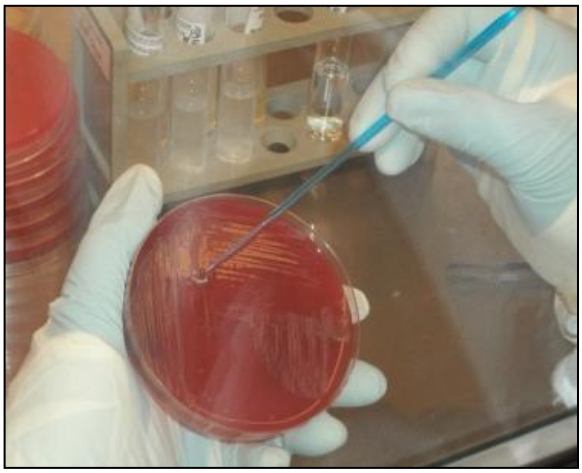
Nous avons testé 6 antibiotiques, utilisés dans le traitement de la brucellose humaine, aux quels *Brucella* est normalement sensible :

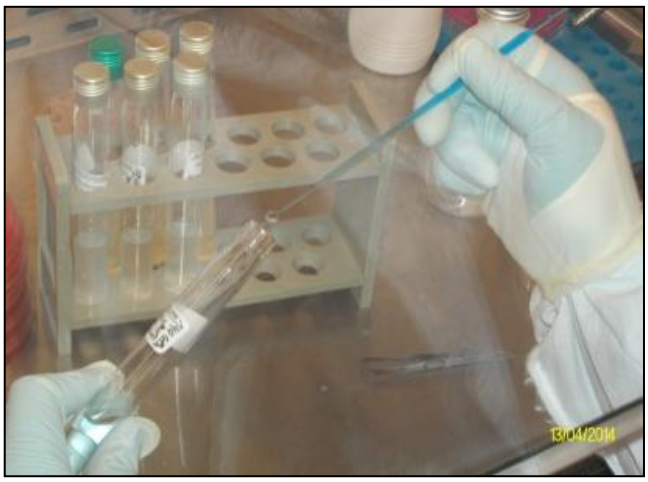
- Streptomycine ;
- Rifampicine ;
- Gentamicine ;
- Tétracycline ;
- Doxycycline ;
- Triméthoprime+sulfaméthoxazole.

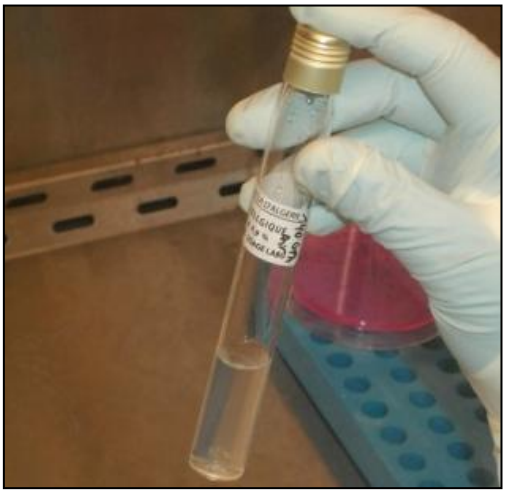
d) Préparation de l'inoculum

Nous devons préparer une suspension bactérienne à 0,5 McFarland dans de l'eau physiologique : (Ne pas générer d'aérosols lors de la préparation de la suspension)

- à partir d'une culture pure de 48 à 72 h sur milieu solide non sélectif, nous raclons à l'aide d'une anse stérile quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ;
- nous déchargeons l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% ;
- nous homogénéisons la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. Nous ajustons par l'utilisation d'un densitomètre.







Figures 5.13: Préparation de l'inoculum

e) Technique

- Nous trempons un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ;
- nous l'essorons en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum ;
- nous frottons l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées ;
- nous répétons l'opération deux fois, en tournant la boite de 60°C à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Nous finissons l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- dans le cas ou l'on ensemence plusieurs boites de Petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

f) Dépôt de la bandelette E-test

- Nous prélevons la bandelette imbibée d'antibiotique à l'aide d'une pince stérile; le contact avec les pinces doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E ;
- nous déposons la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé, puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées. Nous devons éviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.
- A noter que l'on ne peut déposer qu'une ou deux bandelettes E-test au maximum, par boîte de 90 mm de diamètre (risque de chevauchement des ellipses avec plus d'une bandelette).
- nous laissons sécher, la boîte couvercle en haut, pendant 15 mn au plus.

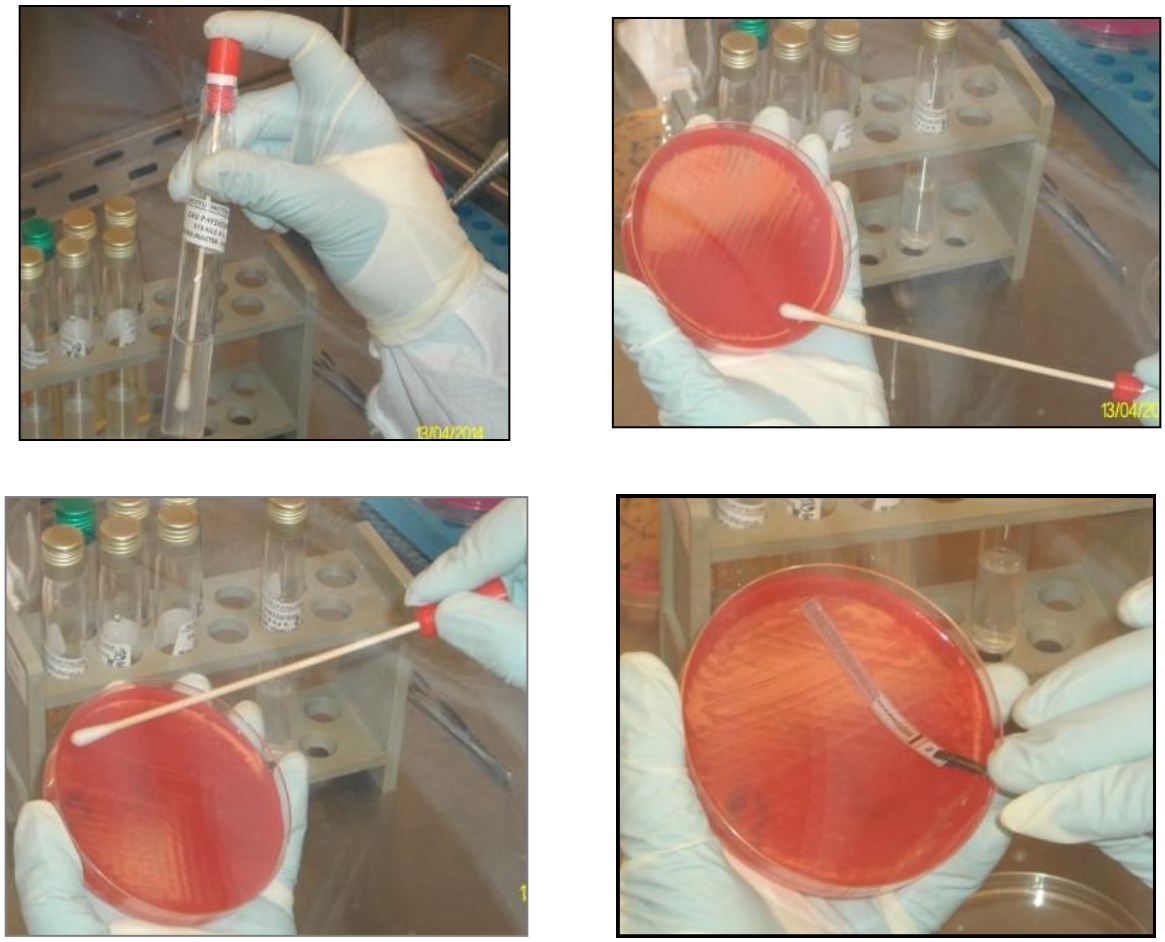


Figure 5.14: Technique de l'E-test

g) Incubation

Nous incubons à 37 ± 2°C pendant 48 H (sous CO_2 pour certains biovars de *B. abortus*).

h) Lecture et interprétation

- A l'œil nu, nous lisons la CMI de l'antibiotique testé, boîte ouverte sous PSM et bien éclairée.
- Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test.
- Nous comparons les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Nous classons la bactérie dans l'une des catégories S (sensible), R (résistante) ou I (intermédiaire).

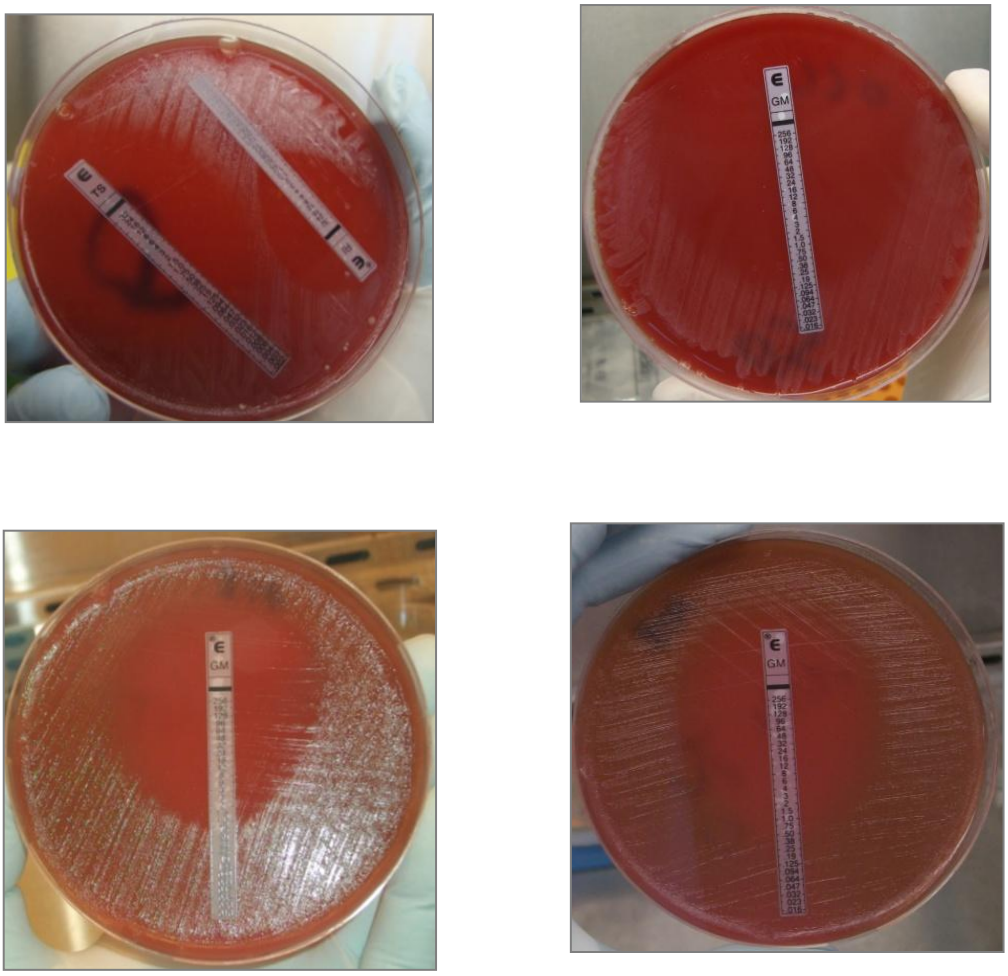


Figure 5.15: E-test de *Brucella* sp.

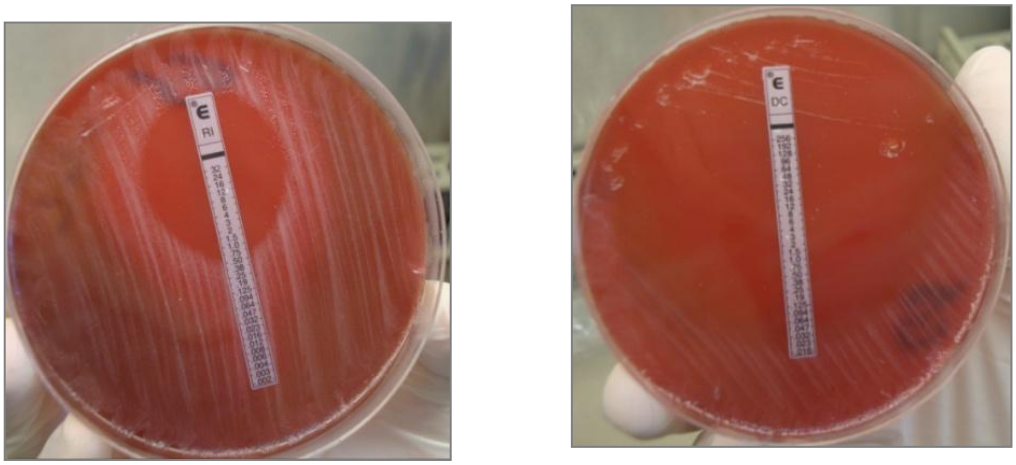


Figure 5.15: E-test de *Brucella* sp.

5. Mise en souchothèque

a) Préparation du bouillon glycérolé

- Nous ajoutons 15 ml de glycérol stérile à 75 ml de bouillon trypticase soja (BTS), pour obtenir une solution à 15 %.
- Nous effectuons un contrôle de stérilité, en mettant le bouillon à 37°C pendant 24h.

b) Matériels nécessaires

- ✓ Cryotubes de 1,5 ml ;
- ✓ écouvillons stériles ;
- ✓ bouillon glycérolé stérile ;
- ✓ souches à conserver en culture sur milieu solide gélosé non sélectif.

c) Mode opératoire

Nous remplissons les cryotubes de 1ml de bouillon glycérolé. Avec un écouvillon stérile, nous raclons la culture bactérienne à la surface du milieu solide gélosé, puis nous ensemençons le bouillon glycérolé de manière à obtenir une suspension bactérienne dense et enfin, nous congelons à -20°C.

Figure 5.16: préparation de la souchothèque

C. Détection du genre *Brucella* par PCR en temps réel (PCR-TR)

1. Extraction de l'ADN à partir des prélèvements des ganglions lymphatiques

a) Broyage des ganglions

Toutes les manipulations de cette étape sont réalisées sous PSM de type II en laboratoire NSB3.
A l'aide d'un bistouri et d'une pince, nous avons dégraissé le ganglion puis découpé en petits morceaux. Nous avons utilisé 5 g environ de l'organe qui est dilacéré et mis dans un sac stomacher (double sac) avec du PBS, puis placé dans le stomacher, et broyé pendant 2 à 3 min. Le broyat est récupéré dans un pilulier stérile.

b) Extraction de l'ADN

Pour la lyse et l'inactivation bactérienne, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Prélever 1 ml de broyat dans un eppendorf,
- centrifuger 5 min à 12 000 tr/min,
- éliminer le surnageant,
- re-suspendre le culot dans 850 µL de TE,
- bien homogénéiser par pipetages successifs, vortexer puis effectuer une centrifugation « pulse »,
- Ajouter 10 µL de virus à ADN du kit IPC DIA-EIC/DNA(YD)-050 (Diagenode) comme contrôle d'extraction d'ADN et d'inhibition ,
- transférer par pipetage dans un tube de Ribolysing ou dans des tubes de 2mL contenant 0,5 mL de billes de verre de 0,1 mm de diamètre,

- vortexer puis centrifuger par un « pulse»,
- agiter 45 secondes à 6 m/s dans le ribolyser,
- Centrifuger par un « pulse» puis récupérer le surnageant,
- Prélever 200 µL pour effectuer l'extraction par Kit Roche HPPTK et/ou 200µL pour effectuer l'extraction par Robot Qiagen
- ajouter 190 µL de buffer G2,
- ajouter 10 µL de protéinase K puis homogénéiser au vortex,
- incuber toute une nuit à 56°C dans un bain marie mouvant.

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du robot Qiagen ou par Kit Roche HPPTK (cf. extraction de l'ADN dans la partie 2) suivant les indications des fournisseurs.

Principe du robot

La technique d'extraction d'ADN par robot Qiagen est basée sur la combinaison de billes magnétiques et de la purification d'ADN par la silice. L'ADN, en présence d'une forte concentration en sel, s'absorbe sur la silice qui enveloppe les billes magnétiques : l'ADN est fixé sur un support récupérable avec un aimant ; ce complexe est capté par celui-ci et va subir 1 rinçage avec de l'eau distillée, puis 2 lavages avec 2 tampons différents. L'élution se fait ensuite avec de l'eau RNAse-free par le volume souhaité. Dans notre cas, le volume d'élution est de 150 µL.

2. Technique de la PCR en temps réel

Cette PCR permet l'identification du genre *Brucella* en ciblant les gènes IS*711*, *bcsp31* et *per* spécifiques du genre (Bounaadja *et al*., 2009).

a) Principe

Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR.
En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système produit des courbes d'amplification exhibant un schéma plus complet du processus de la PCR.
L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction.

b) Mode opératoire

Chaque cible (IS*711*, *bcsp31* et *per*) est amplifiée par des réactions individuelles avec leurs amorce et sondes respectives.

IS*711* & IPC diagenode DIA-EIC/DNA(YD)-050

Réactif pour 1 PCR en µL	
Eau ultrapure	4,15
Taqman Master Mix [2 X] (1X)	12,5
Amorces et sondes IPC diagenode	2,5
Amorce IS711 Fd [20µM] (0,3µM)	0,375
Amorce IS711 Rv [20µM] (0,3µM)	0,375
Sonde IS711 [50µM] (0,25µM)	0,1
ADN testé (1 µg/mL)	5
Total	25

***bcsp31* simplex ; *per* simplex**

Réactif pour 1 PCR en µL	
Eau ultrapure	6,65
Taqman Master Mix [2 X] (1X)	12,5
Amorce Fd [20µM] (0,3µM)	0,375
Amorce Rv [20µM] (0,3µM)	0,375
Sonde [50µM] (0,25µM)	0,1
ADN testé (1 µg/mL)	5
Total	25

Les cycles d'amplification de l'ADN sont enregistrés en temps réel.

c) Interprétation des résultats

La valeur de cycle correspondant au signal seuil est appelée Ct (Cycle Threshold). Elle représente le cycle de PCR à partir duquel une augmentation notable de la fluorescence par rapport au bruit de fond est détectée. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon avant la PCR. Un Ct précoce correspond à un échantillon contenant beaucoup d'ADN cible, un Ct tardif à un échantillon peu contaminé. Les valeurs de Ct obtenues en fonction du log des concentrations en molécules d'ADN.

Dans notre étude, un contrôle de l'extraction d'ADN et de l'inhibition d'amplification est appelé IPC doit présenter un Ct.

Négatif : le contrôle IPC présente un Ct, les cibles IS*711*, *bcsp31* et *per* sont indéterminés ou avec des Ct élevés

Positifs : le contrôle IPC présente un Ct, au moins deux cibles présentent un Ct avec des < 43-44 , pour la cible IS*711* Ct < 40.

Si le contrôle IPC est indéterminé, la PCR est inhibée.

II. PLAN D'ANALYSE

A. Description de la population d'étude

Au cours de notre étude, nous avons collecté des prélèvements d'octobre 2011 à mai 2014, à partir d'animaux séropositifs à un ou deux tests sérologiques, détectés lors du dépistage de la brucellose, dans le cadre du programme de lutte mis en place par les services vétérinaires. Notre étude a été donc réalisée exclusivement sur des animaux séropositifs.

Nous avons ciblé les bovins car les autres espèces (ovine et caprine) font l'objet d'une vaccination de masse, ce qui entrave le dépistage sérologique simultané pour la détection d'animaux séropositifs.

a) Nombre d'animaux étudiés

Durant deux ans et sept mois (d'octobre 2011 à mai 2014), nous avons pu recruter et étudier 161 bovins séropositifs provenant de 97 foyers, dont 160 femelles et 1 mâle, âgés de 2 à 13 ans, de différentes races (locale, Montbéliarde, Holstein, Brune des Alpes, Frisonne et croisée).
Notre échantillon est composé d'une majorité de femelles séropositives. Cette constatation a été observée lors de notre précédent travail sur la séroprévalence de la brucellose chez les bovins de la région centre (mémoire de Magistère), où le taux de femelles séropositives était plus élevé (Lounes, 2007). Dans le présent travail, cette observation pourrait s'expliquer aussi par le fait, que les bovins dépistés sont en majorité des femelles.

i) Nombre d'animaux étudiés par région

Les bovins étudiés sont issus de 56 communes, réparties sur 13 wilayas, des quatre régions d'Algérie : Centre (Alger, Blida, Médéa, M'sila, Bordj Bou Arreridj, Tizi Ouzou et Béjaïa), Ouest (Tlemcen et Oran), Est (Jijel et El Taref) et Sud (Laghouat et Ouargla) (voir tableau 5.1 et fig. 5.17).

Bien que la wilaya d'Annaba fût incluse dans le réseau vétérinaire de l'étude (nous avons inclus l'abattoir d'Annaba), nous n'avons pu collecter aucun prélèvement de cette wilaya, car il n'y a pas eu d'abattage sanitaire pour cause de brucellose durant toute la période d'étude.
Au niveau des trois abattoirs d'Alger (Hussein Dey, El Harrach et Rouiba), nous avons prélevé principalement des animaux séropositifs issus des wilayas de Tizi Ouzou et Béjaïa.

Tableau 5.1 : Nombre d'animaux et d'élevages étudiés par wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre d'animaux	Nombre d'élevages
Centre	Alger	8	4
	Blida	24	16
	Médéa	4	4
	M'sila	6	2
	Bordj Bou Arreridj	3	1
	Tizi Ouzou	15	11
	Béjaïa	31	14
Total centre		**91**	**52**
Est	Jijel	22	16
	El Taref	17	7
	Annaba	0	0
Total Est		**39**	**23**
Ouest	Tlemcen	18	12
	Oran	3	1
Total Ouest		**21**	**13**
Sud	Laghouat	9	8
	Ouargla	1	1
Total Sud		**10**	**9**
Total Algérie		**161**	**97**

Le tableau 5.2 résume le nombre d'animaux étudiés selon les quatre régions d'Algérie :

Tableau 5.2 : Nombre d'animaux étudiés par région.

Régions	Nombre d'animaux étudiés	Pourcentage (%)
Centre	91	**56,5%**
Est	39	**24,2%**
Ouest	21	**13,0%**
Sud	10	**6,2%**
Total Algérie	**161**	100%

Nous notons que la moitié des animaux étudiés sont issus de la région Centre et un quart de la région Est (tableau 5.2). En effet, 7 wilayas sur les 13 étudiées appartiennent à la région Centre. Nous avons étudié 7 wilayas au centre, versus 2 wilayas pour chacune des autres régions (Tableau 5.1). Ceci s'explique par le fait qu'au début du lancement du réseau vétérinaire, nous avons ciblé au centre, les deux wilayas d'Alger et Blida. Puis au cours de l'étude, nous avons pu collecter des prélèvements d'animaux d'autres wilayas centre. Ceci est dû en premier, aux nombre important d'animaux des wilayas de Tizi Ouzou et Béjaïa (non inclus au début) abattus dans les abattoirs d'Alger ; en second, la majorité des animaux étudiés hors réseau étaient de la région centre, car prélevés par des confrères vétérinaires et étudiants de l'ENSV. Ce qui était au final à notre avantage car cela nous a permis de toucher plus d'animaux et plus de wilayas (Fig. 5.17).

Par contre, dans certaines wilayas ciblées, nous n'avons pu étudier que très peu d'animaux, dû parfois à la collaboration relative des vétérinaires pour prélever des animaux brucelliques ou pour nous avertir de la déclaration ou de l'abattage d'un cas séropositif. Mais essentiellement dû à la diminution constatée de moitié du nombre d'animaux dépistés annuellement, depuis 2010, à l'échelle nationale. En effet, le nombre d'animaux dépistés passe d'environ 150000 en 2007, à 85000 en 2012 (DSV, 2014). Cette baisse de dépistage coïncide avec la mise en place depuis 2008, du programme de développement de la production nationale de lait cru, dont l'un des objectifs principaux est l'augmentation maximale de la collecte de lait cru (Bulletin info élevage, 2013). Ainsi, pour encourager cette collecte de lait, les éleveurs ne sont plus obligés de présenter un agreement sanitaire (élevage indemne de brucellose/tuberculose), donc ne sont plus contraint de faire le dépistage de leurs animaux. Par conséquent, la détection d'animaux brucelliques se voit diminuer.

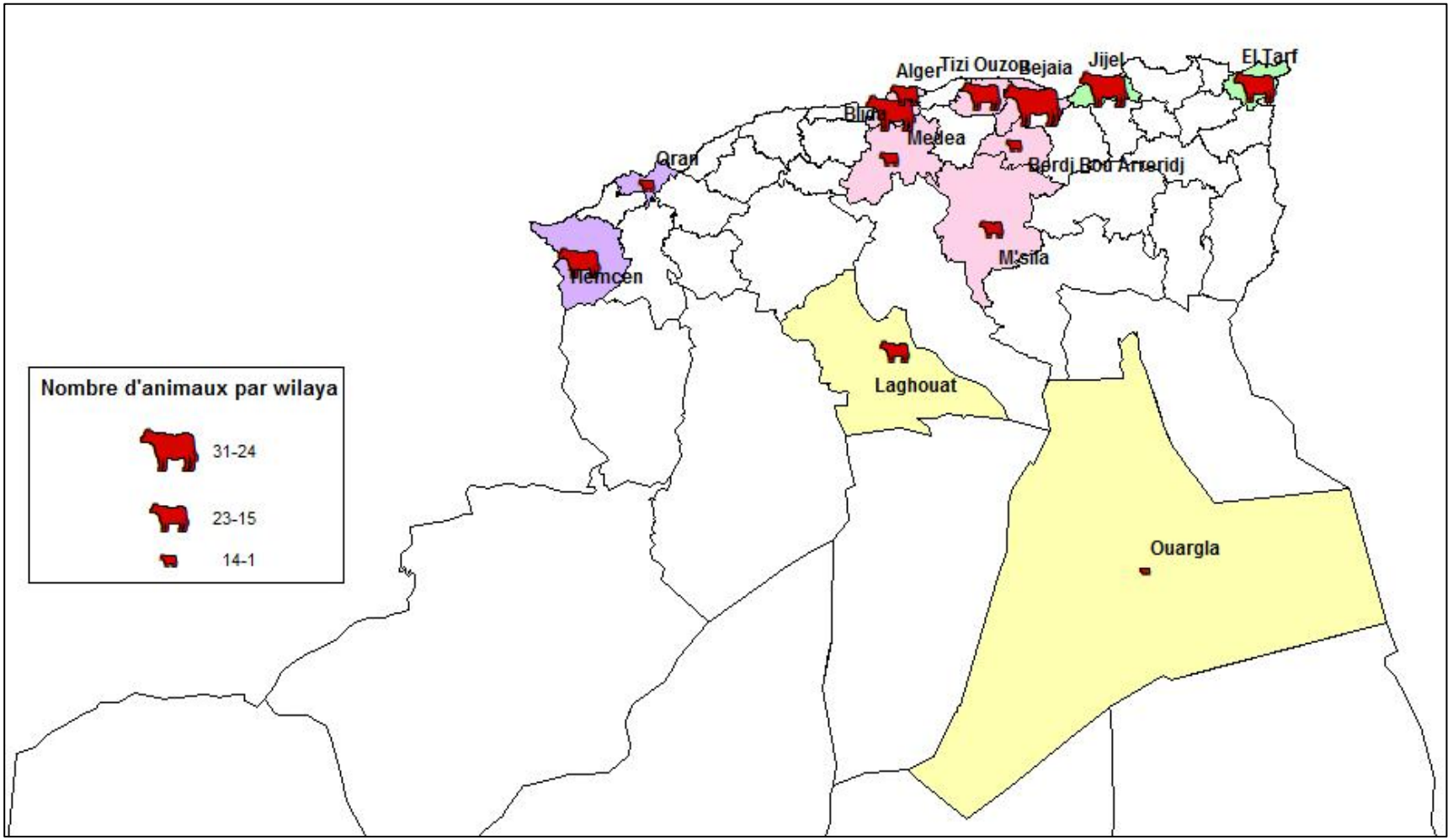


Figure 5.17: Distribution du nombre de bovins étudiés par wilaya.

ii) Age des animaux étudiés

Les bovins étudiés sont âgés entre 2 et 13 ans, dont la majorité (83%) se situe dans la tranche d'âge de 2 à 7 ans. Presque la moitié est dans la tranche d'âge de 2 à 4 ans, plus d'un tiers de 5 à 7 ans. Nous constatons dans notre échantillon, un nombre réduit d'animaux âgés de plus de 8 ans. Car dans les élevages de rente, il y a moins de bovins de cet âge puisque souvent réformés. Notons que nous manquons d'informations concernant l'âge de 10% des animaux prélevés (Fig. 5.18)

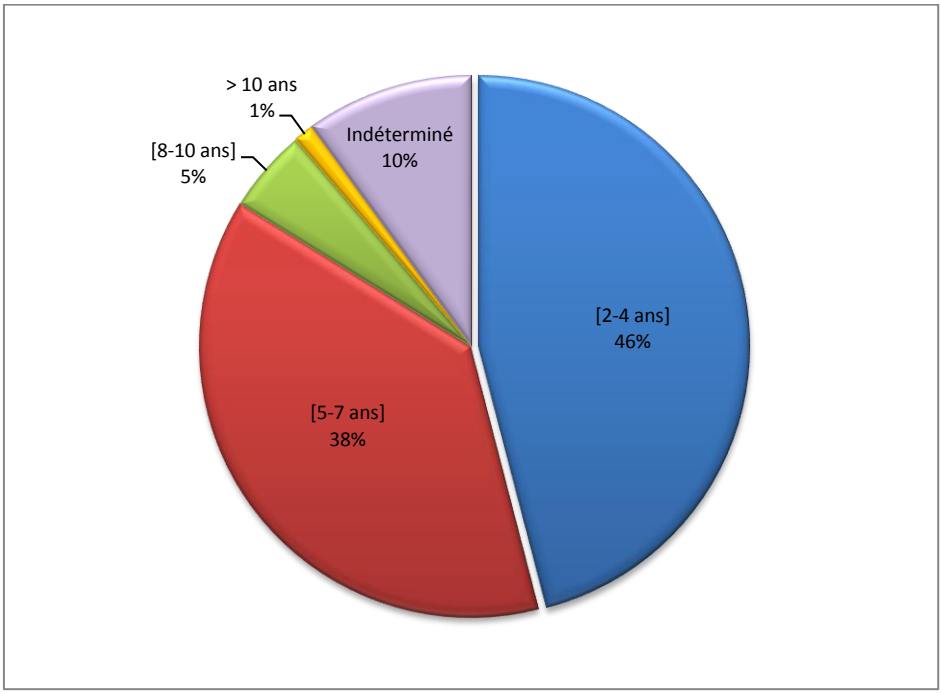


Figure 5.18: Répartition des animaux étudiés selon l'âge.

iii) Races des animaux étudiés

Les bovins étudiés appartiennent aux différentes races existantes en Algérie. Dans notre échantillon, plus d'un quart des bovins sont de race Holstein (26%), suivi des bovins croisés (23%), en troisième position la population locale (19%), puis la race Montbéliarde (17%), et quelques bovins des races Brune des Alpes et Frisonne. Notons que nous n'avons pas eu de données concernant la race de 11% des bovins prélevés (Fig. 5.19). Nous n'avons pas trouvé des données disponibles sur les effectifs de la population bovine algérienne par race afin de comparer ces proportions.

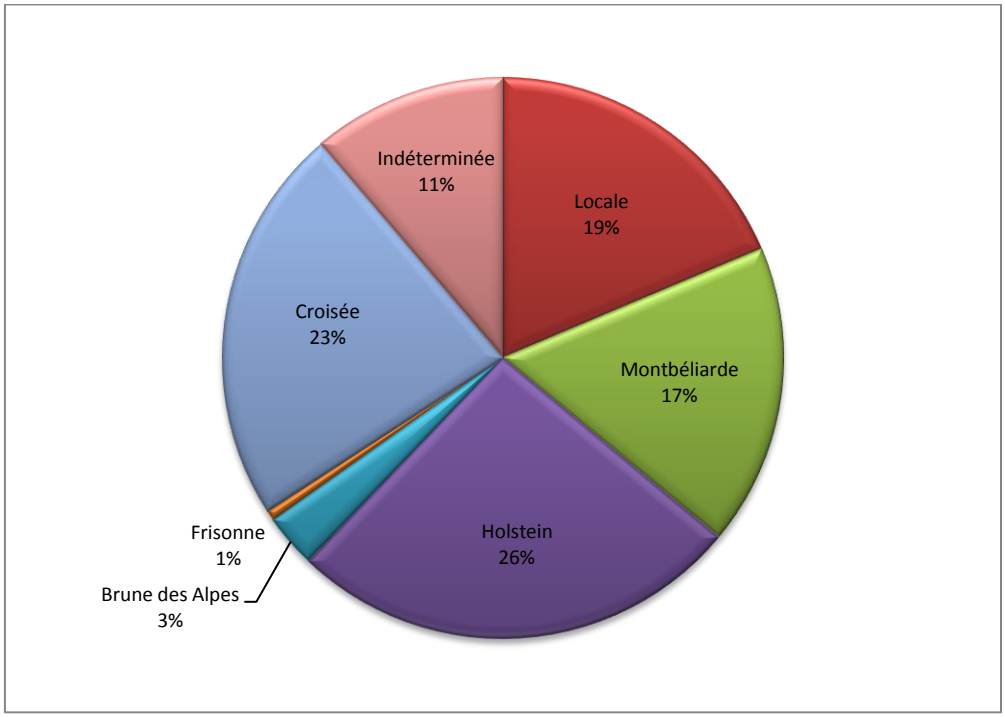


Figure 5.19: Répartition des animaux étudiés selon la race.

iv) Signes cliniques présentés par les animaux étudiés

Sur les 160 femelles séropositives prélevées, 43 ont présenté des signes cliniques de brucellose, dont 41 ont présenté des avortements et 6 des rétentions placentaires parmi lesquelles 4 ont présenté simultanément les deux symptômes. Une seule femelle a présenté une arthrite associée à un avortement. Le seul mâle prélevé de l'échantillon ne présentait aucun signe clinique.

B. Nombre de prélèvements réalisés

Pour chaque bovin étudié, nous avons ciblé trois types de prélèvements : lait, ganglions rétro-pharyngiens et rétro-mammaires. Dans 3 cas, des ganglions inguinaux ont été également prélevés. Ainsi, les 161 bovins étudiés ont fait l'objet de **298** prélèvements (voir tableaux 5.3 et 5.4).

Tableau 5.3: Nombre de prélèvements réalisés par wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre Animaux	Nombre prélèvements
Centre	Alger	8	8
	Blida	24	28
	Médéa	4	4
	M'sila	6	6
	Bordj Bou Arreridj	3	3
	Tizi Ouzou	15	32
	Béjaïa	31	79
Total Centre		**91**	**160**
Est	Jijel	22	50
	El Taref	17	23
Total Est		**39**	**73**
Ouest	Tlemcen	18	39
	Oran	3	3
Total Ouest		**21**	**42**
Sud	Laghouat	9	22
	Ouargla	1	1
Total Sud		**10**	**23**
Total Algérie		**161**	**298**

Le tableau 5.4 résume le nombre de prélèvements réalisés par région :

Tableau 5.4 : Nombre de prélèvements réalisés par région.

Régions	Nombre de prélèvements	Pourcentage (%)
Centre	160	**53,7%**
Est	73	**24,5%**
Ouest	42	**14,0%**
Sud	23	**7,7%**
Total Algérie	**298**	**100%**

Plus de la moitié des prélèvements réalisés (54%) proviennent de la région Centre suivi de la région Est avec un quart des prélèvements (24,5%) (voir tableau 5.4). Ceci s'explique par un plus grand nombre d'animaux étudiés dans ces régions (tableau 5.2). Mais aussi, par le fait que

dans la wilaya d'Oran à l'Ouest et la wilaya de Ouargla au Sud, un seul élevage a été étudié avec trois et un animal prélevé respectivement.

a) Nombre de prélèvements réalisés selon le type de prélèvement

Sur les 298 prélèvements réalisés, nous avons effectué 109 prélèvements de lait et 189 prélèvements de ganglions, dont 97 rétro-pharyngiens, 89 rétro-mammaires et 3 inguinaux (voir tableau 5.5 et fig. 5.20).

Tableau 5.5 : Nombre de prélèvements par wilayas et par type de prélèvements.

Régions	Wilayas	Nombre de prélèvements				
		Lait	Ganglions lymphatiques	Ganglions pharyngiens	Ganglions mammaires	Ganglions inguinaux
Centre	Alger	8	0	0	0	0
	Blida	23	5	2	2	1
	Médéa	4	0	0	0	0
	M'sila	6	0	0	0	0
	Bordj Bou Arreridj	3	0	0	0	0
	Tizi Ouzou	14	18	9	9	0
	Béjaïa	23	56	30	25	1
Total centre		**81**	**79**	**41**	**36**	**2**
Est	Jijel	5	45	22	22	1
	El Taref	10	13	7	6	0
Total Est		**15**	**58**	**29**	**28**	**1**
Ouest	Tlemcen	5	34	18	16	0
	Oran	3	0	0	0	0
Total Ouest		**8**	**34**	**18**	**16**	**0**
Sud	Laghouat	4	18	9	9	0
	Ouargla	1	0	0	0	0
Total Sud		**5**	**18**	**9**	**9**	**0**
Total Algérie		**109**	**189**	**97**	**89**	**3**

La carte suivante représente la répartition de la proportion des différents types de prélèvements dans les wilayas étudiées :

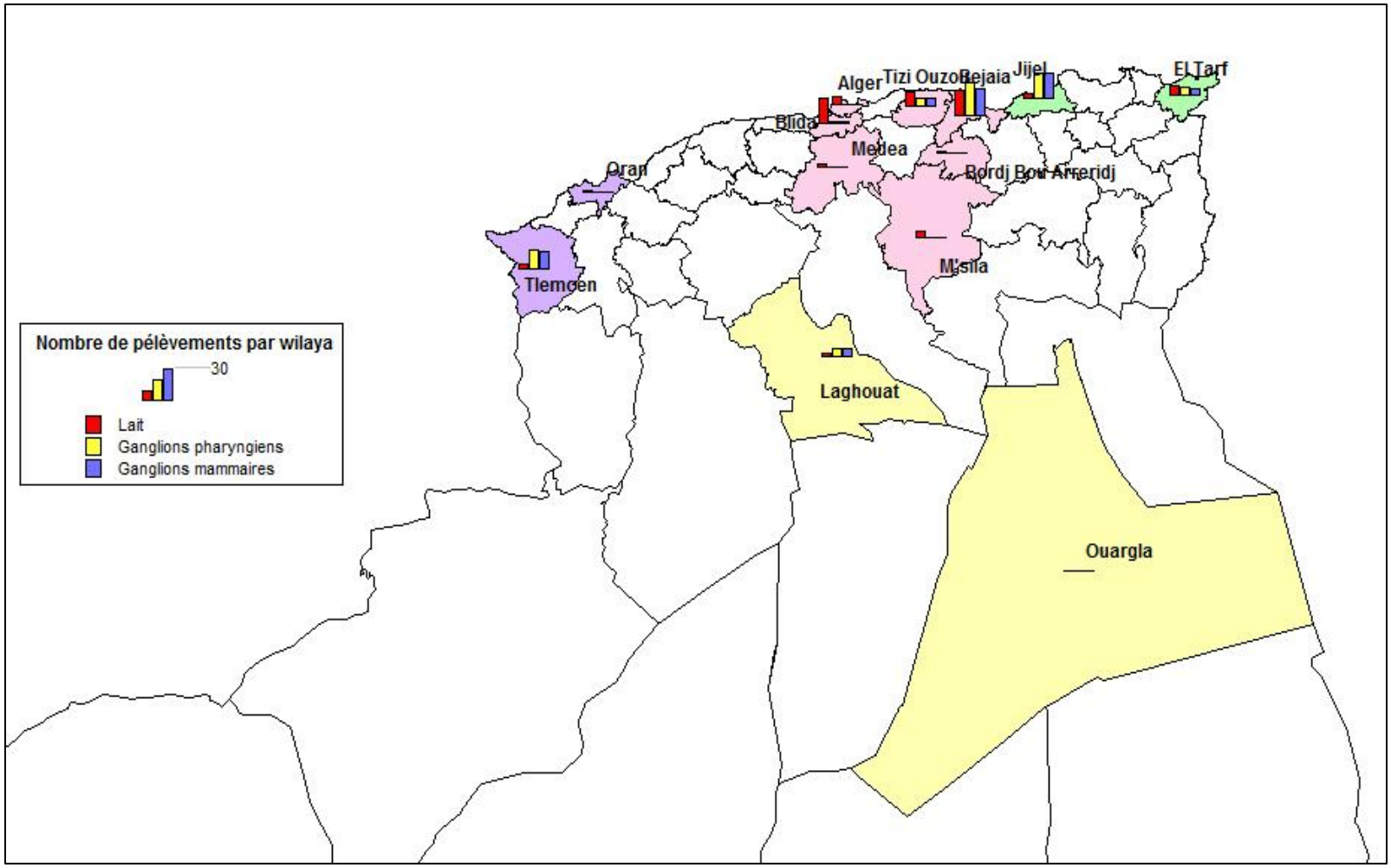


Figure 5.20: Distribution du nombre de prélèvements par wilaya selon les types de prélèvements réalisés.

Nous constatons que dans la région centre, nous avons pu collecter en majorité des prélèvements de lait dans les wilayas d'Alger, Blida, Médéa, M'sila et Bordj Bou Arreridj (Tableau 5.5 et Fig.5.20). Car dans ces wilayas, c'est nous même qui faisions les prélèvements de lait du vivant de l'animal, au niveau des élevages, dès qu'un cas séropositif est déclaré. Mais souvent, ces animaux sont perdus de vue, car l'abattage ne se faisait pas dans des délais courts et/ou dans les abattoirs inclus dans l'étude. Les animaux sont soit abattus dans des tueries ou hors wilaya.

Nous remarquons que pour les deux wilayas de Béjaïa et Tizi Ouzou, les trois types de prélèvements sont à des proportions presque égales (Tableau 5.5 et Fig.5.20). Car la plupart des prélèvements de ces deux wilayas ont été collectés au niveau des abattoirs d'Alger, c'est nous même qui faisions les prélèvements en anté et post- mortem.

Dans les autres régions (Ouest, Est et Sud), les prélèvements étaient collectés grâce au réseau national vétérinaire mis en place pour l'étude. On constate que la proportion des prélèvements de ganglions lymphatiques est plus importante que celle du lait (Tableau 5.5 et Fig.5.20). Dû au fait, qu'il est plus facile de faire les prélèvements aux abattoirs qu'en élevage. Il faut noter que souvent les élevages sont très éloignés et difficiles d'accès pour les vétérinaires du terrain.

Si nous assemblons la totalité des prélèvements réalisés par type de prélèvement, sans s'intéresser à la région de provenance. Nous obtenons les proportions représentées dans le secteur suivant :

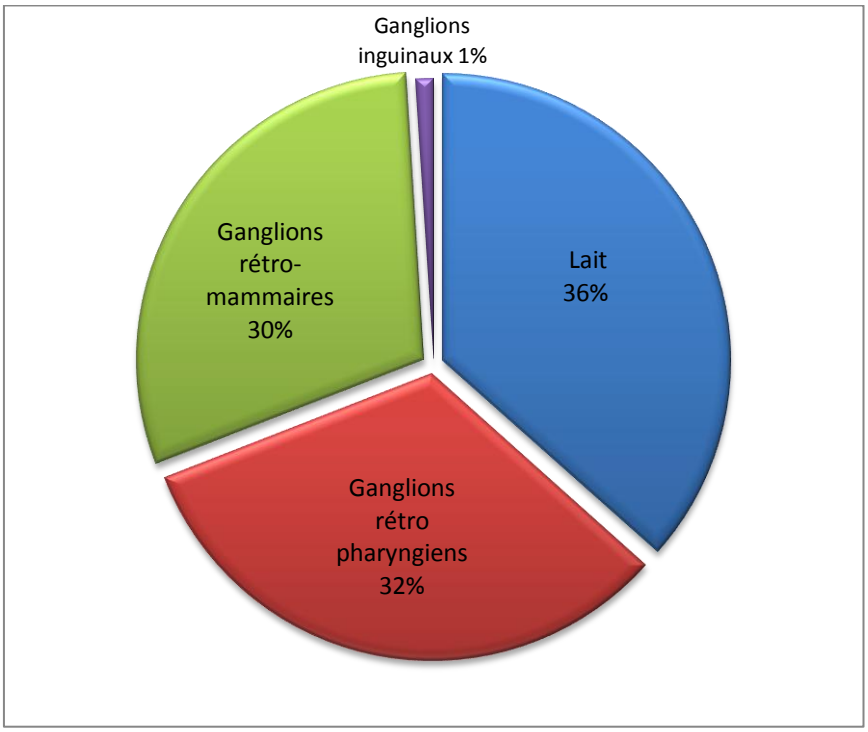


Figure 5.21 : Proportion de chaque type de prélèvements.

Sur le total des prélèvements ciblés, nous constatons que les proportions de chaque type de prélèvement sont très proches et pratiquement égales pour les trois types de prélèvements ciblés (voir Fig. 5.21). Les ganglions inguinaux n'étaient pas ciblés, leur prélèvement a été effectué exceptionnellement dans 3 cas.

b) Nombre de prélèvements par animal étudié

Les 3 types de prélèvements ciblés n'ont pas pu être systématiquement réalisés pour chaque animal (voir tableau 5.6).

Tableau 5.6 : Nombre de prélèvements réalisés par animal.

Nombre de prélèvements par animal	Nombre de bovins prélevés	Pourcentage (%)
1 prélèvement	69	**42,8%**
2 prélèvements	49	**30,4%**
3 prélèvements	41	**25,5%**
4 prélèvements	2	**1,2%**

Nous n'avons pu réaliser les trois types de prélèvements ciblés que sur un peu plus d'**un quart** des animaux étudiés. En réalité, le nombre de prélèvements effectués sur un animal dépend des contraintes du terrain, tel que l'éloignement des foyers détectés, la durée entre la détection de l'animal séropositif et le jour de son abattage (qui peut aller à 3 mois ou plus), le lieu de son abattage (abattage sanitaire hors wilaya ou dans des tueries qui ne sont pas inclus dans l'étude), vache en période de tarissement ; mais aussi, de la volonté et de la collaboration relatives des vétérinaires pour réaliser tous les prélèvements ou pour nous avertir de la détection ou de l'abattage d'un animal séropositif.

c) Nombre de prélèvements par animal selon les régions étudiées

Dans certaines wilayas, nous avons pu récolter les 3 types de prélèvements et dans d'autres, un seul type a pu être effectué (tableau 5.7).

Tableau 5.7 : Nombre de prélèvements réalisés par animal dans chaque wilaya étudiée.

Wilayas	Nombre de prélèvements par animal			
	Un	**Deux**	**Trois**	**Quatre**
Alger	8	0	0	0
Blida	22	1	0	1
Médéa	4	0	0	0
M'sila	6	0	0	0
BBA	3	0	0	0
Tizi Ouzou	6	1	8	0
Béjaïa	3	9	18	1
Centre	**52**	**11**	**26**	**2**
Jijel	0	16	6	0
El Taref	11	6	0	0
Est	**11**	**22**	**6**	**0**
Tlemcen	2	11	5	0
Oran	3	0	0	0
Ouest	**5**	**11**	**5**	**0**
Laghouat	0	5	4	0
Ouargla	1	0	0	0
Sud	**1**	**5**	**4**	**0**
Total Algérie	**69**	**49**	**41**	**2**

Nous constatons que nous avons pu collecter le plus grand nombre de prélèvements des wilayas de Béjaïa et Tizi Ouzou, avec le plus grand nombre d'animaux sur lesquels, nous avons pu réaliser les trois types de prélèvements ciblés. Puis la wilaya de Jijel à l'Est.

Le tableau 5.8 résume le nombre de prélèvements réalisés par animal dans les 4 régions :

Tableau 5.8 : Nombre de prélèvements par animal dans chaque région étudiée.

Régions	**Nombre de bovins**			**Total**
	1 prélèvement	**2 prélèvements**	**3 prélèvements et plus**	
Centre	52 *(57,1%)*	11 *(12,0%)*	28 *(30,8%)*	**91**
Est	11 *(28,2%)*	22 *(56,4%)*	6 *(15,4%)*	**39**
Ouest	5 *(23,8%)*	11 *(52,4%)*	5 *(23,8%)*	**21**
Sud	1 *(10%)*	5 *(50%)*	4 *(40%)*	**10**

X^2= 32,98 ; p = 10^{-6} *

*** Nous avons calculé le X^2 pour comparer les régions Centre, Est et Ouest. Nous n'avons pas pu intégrer la région Sud car les effectifs sont inferieurs ou égale à 5 (le X^2 ne peut être calculé dans ce cas).*

Les différences sont significatives entre les régions (X^2=32,98 – p = 10^{-6}). C'est La région Centre qui enregistre le plus d'animaux avec 3 prélèvements et plus (30,8 %), versus 23,8 % et 15,4 %, respectivement pour les régions Ouest et Est. Ceci s'explique par le fait que le plus grand nombre de prélèvements effectués au niveau de la région Centre sont des prélèvements d'animaux provenant des wilayas de Béjaïa et Tizi Ouzou, abattus dans les abattoirs d'Alger, où nous avons effectué personnellement les prélèvements (cf. Nombre de prélèvements réalisés selon le type de prélèvement).

La population d'étude dont la période de recrutement s'est étalée sur plus de deux ans et demi, est constituée majoritairement de femelles séropositives. Ces vaches sont de différentes races, en majorité âgées de 2 à 7ans. La moitié des animaux étudiés sont issus de la région Centre, le quart de l'Est, le reste provient de l'Ouest et du Sud. Nous avons ciblé 3 types de prélèvements (lait, ganglions rétro-pharyngiens et rétro-mammaires), mais nous n'avons pu les réaliser que sur un quart des animaux étudiés à cause des contraintes rencontrées au cours de cette étude.

III. RESULTATS & DISCUSSIONS

Le premier objectif de notre étude est d'identifier par typage phénotypique les souches de *Brucella* responsables de la brucellose bovine en Algérie. Les résultats du typage phénotypique sont représentés dans la partie suivante :

A. Résultats du typage phénotypique

Le typage phénotypique consiste en l'identification des souches de *Brucella*, isolées des prélèvements réalisés, sur les animaux séropositifs étudiés.

Rappelons que tous les résultats présentés ici, que nous appelons **positifs,** sont des résultats **positifs en bactériologie**, ce qui veut dire **isolement de *Brucella***.

1. Nombre d'élevages positifs

Les animaux étudiés proviennent de 97 foyers bovins des quatre régions, les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5.9 : Nombre d'élevages positifs par wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre d'élevages étudiés	Nombre d'élevages positifs	Pourcentage (%)
Centre	Alger	4	1	25,0%
	Blida	16	6	37,5%
	Médéa	4	1	25,0%
	M'sila	2	0	0,0%
	Bordj Bou Arreridj	1	0	0,0%
	Tizi Ouzou	11	4	36,4%
	Béjaïa	14	9	64,3%
Total Centre		**52**	**21**	**40,4%**
Est	Jijel	16	7	43,8%
	El Taref	7	1	14,3%
Total Est		**23**	**8**	**34,8%**
Ouest	Tlemcen	12	7	58,3%
	Oran	1	1	100%
Total Ouest		**13**	**8**	**61,5%**
Sud	Laghouat	8	3	37,5%
	Ouargla	1	0	0,0%
Total Sud		**9**	**3**	**33,3%**
Total Algérie		**97**	**40**	**41,2%**

Sur les 97 foyers étudiés dans toutes les régions, nous avons pu isoler des *Brucella* dans 40 élevages, ce qui représente un taux de **41%, IC 95% : [31,4 - 51]%**. Ce qui confirme que ces 40 élevages sont des foyers brucelliques.

Tableau 5.10 : Nombre d'élevages positifs par région.

Régions	Nombre d'élevages étudiés	Nombre d'élevages positifs	Pourcentage (%)	IC 95%
Centre	52	21	**40,4%**	[27,1 - 53,7%]
Ouest	13	8	**61,5%**	[35 - 88%]
Est	23	8	**34,8%**	[15,3 - 54,3%]
Sud	9	3	**33,3%**	[2,5 - 64,1%]
Total Algérie	**97**	**40**	**41,2%**	[31,4 - 51 %]

X^2 = 2,85 ; p =0,24 *

** Pour le calcul du X^2, les effectifs de la région Sud sont inférieurs à 5. Afin de pouvoir comparer les résultats, nous avons regroupé les régions Sud et Est car les pourcentages sont très proches.*

La différence n'est pas statistiquement significative entre les régions (*X^2 = 2,85 ; p =0,24*), le pourcentage d'élevages positifs ne semble pas différents entre les régions.

2. Nombre d'animaux positifs

Au cours de notre étude, nous avons prélevé 161 bovins séropositifs, détectés lors du dépistage de la brucellose. Nous avons tenté d'isoler des *Brucella* sur ces animaux.

Le tableau 5.11 montre le nombre d'animaux positifs dans les foyers confirmés brucelliques par la bactériologie.

Tableau 5.11 : Nombre d'animaux positifs par rapport aux foyers par région et par wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre d'élevages positifs	Nombre Animaux positifs
Centre	Alger	1	5
	Blida	6	7
	Médéa	1	1
	M'sila	0	0
	Bordj Bou Arreridj	0	0
	Tizi Ouzou	4	6
	Béjaïa	9	21
Total centre		**21**	**40**
Est	Jijel	7	9
	El Taref	1	3
Total Est		**8**	**12**
Ouest	Tlemcen	7	11
	Oran	1	3
Total Ouest		**8**	**14**
Sud	Laghouat	3	3
	Ouargla	0	0
Total Sud		**3**	**3**
Total Algérie		**40**	**69**

Dans notre étude, nous n'avons prélevé que des bovins au préalable séropositifs à un ou deux tests sérologiques (EAT seul ou EAT + FC). Cependant, nous avons isolé des *Brucella* à partir de **69** bovins séropositifs provenant des 40 foyers confirmés brucelliques.

Le tableau 5.12 représente le nombre d'animaux à partir desquels nous avons isolé des *Brucella* par rapport au nombre total d'animaux étudiés :

Tableau 5.12 : Nombre d'animaux positifs par wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre d'animaux étudiés	Nombre d'animaux positifs	Nombre d'animaux négatifs	Pourcentage
Centre	Alger	8	5	3	62,5%
	Blida	24	7	17	29,2%
	Médéa	4	1	3	25,0%
	M'sila	6	0	6	0,0%
	Bordj Bou Arreridj	3	0	3	0,0%
	Tizi Ouzou	15	6	9	40,0%
	Béjaïa	31	21	10	67,7%
Total centre		**91**	**40**	**51**	**44,0%**
Est	Jijel	22	9	13	40,9%
	El Taref	17	3	14	17,6%
Total Est		**39**	**12**	**27**	**30,8%**
Ouest	Tlemcen	18	11	7	61,1%
	Oran	3	3	0	100%
Total Ouest		**21**	**14**	**7**	**66,7%**
Sud	Laghouat	9	3	6	33,3%
	Ouargla	1	0	1	0,0%
Total Sud		**10**	**3**	**7**	**30,0%**
Total Algérie		**161**	**69**	**92**	**42,9%**

Sur les 161 bovins brucelliques étudiés dans toutes les régions, nous avons isolé des *Brucella* sur 69 animaux, ce qui représente un taux de positivité en bactériologie de **43%** avec IC 95% : [35,4 – 50,6] %.

Presque la moitié des animaux positifs en sérologie sont également positifs en bactériologie. Cependant, nous n'avons pas pu isoler des *Brucella* sur 92 bovins séropositifs, soit l'autre moitié (57%). D'autres études bactériologiques dans différentes régions du monde, sur différentes espèces animales et différents types de prélèvements rapportent les mêmes constations (Amin et al., 2001; Hamdy and Amin, 2002; Ilhan et al., 2008; Manterola et al., 2003). Ceci peut être dû à différents paramètres :

- le lieu d'entrée et de multiplication de la bactérie qui peut être différent des lieux de prélèvements ciblés ;
- le manque de la totalité des prélèvements chez 73% des animaux étudiés ;
- le stade de la maladie peut influencer le nombre et la localisation ainsi que la période d'excrétion des *Brucella* ;
- la sensibilité des bactéries aux conditions de réalisation du prélèvement (parfois très contaminés), aux conditions de transport (wilayas loin de 700 à 800 Km) et à la durée de conservation des prélèvements (à -20°C durant de 1 à 6 mois).

En effet, le stade de l'infection peut très bien influencer le nombre et la localisation des *Brucella*. Réellement, nous ne connaissons pas le stade de l'infection des bovins étudiés. Cependant, ces bovins ont été diagnostiqués comme positifs pour les anticorps de *Brucella* par l'EAT et la FC et par conséquent, ils avaient évidemment une réponse immunitaire humorale augmentée pendant un certain temps. Tandis que les *Brucella* sont excrétés durant les premiers stades de l'infection ou de façon intermittente, les prélèvements utilisés dans cette étude peuvent avoir été collectés au cours des stades tardif ou chronique de l'infection où l'excrétion de la bactérie s'est arrêtée (Ganière, 2004 ; Comité des experts brucellose, 1986 ; Acha et al., 1989).

En outre, certains de ces animaux peuvent fausser les résultats séropositifs dus à une infection par d'autres micro-organismes Gram-négatifs, tel que *Yersinia enterocolitica* O:9 en particulier, ou *Salmonella urbana*, *E. coli* O: 157, et *Pseudomonas maltophilia* (réaction croisée faussement positive) (Muñoz et al., 2005; Pouillot et al., 1998).

Les tests sérologiques utilisés sont très sensibles, les résultats faussement négatifs en bactériologie peuvent aussi être attribués à une contamination massive des échantillons, ou à cause de l'effet inhibiteur de certains antibiotiques, complété dans le milieu sélectif, sur la croissance de certaine *Brucella* (Blasco, 1992).

Tableau 5.13 : Nombre d'animaux positifs par région

Régions	Nombre d'animaux étudiés	Nombre Animaux positifs	Nombre d'animaux négatifs	Pourcentage	IC 95%
Centre	91	40	51	**44%**	[33.8 - 54.2%]
Est	39	12	27	**30,8%**	[16.3 - 45.3%]
Ouest	21	14	7	**66,7%**	[46.5 - 86.9%]
Sud	10	3	7	**30%**	[1.6 - 58.4%]
Total Algérie	**161**	**69**	**92**	**42,9%**	[35.4 - 50.6%]

X² = 7,91 ; p = 0,048 *

** X^2 calculé sans la région Sud car les effectifs sont inferieurs à 5.*

Nous retrouvons un taux de positivité significativement différent selon la région (*X^2 = 7,91 – p = 0,048*). Ainsi, le taux de positivité le plus élevé est observé à l'Ouest.

Le taux d'animaux positifs le plus élevé est observé au niveau de la région Ouest avec 67%, alors qu'il est respectivement de 44, 31 et 30% dans la région Centre, Est et Sud. Paradoxalement, les régions avec le plus grand nombre d'animaux étudiés et de prélèvements par animal (3 et plus) provenaient de la région centre.

Dans notre étude, la région Ouest est représentée en majorité par la wilaya de Tlemcen. En effet, cette wilaya est une région à forte prévalence de la brucellose bovine, puisque un nombre important de foyers sont déclarés chaque année dans cette wilaya (DSV, 2007 ; 2010) (cf. chapitre 3, voir fig. 3.5).

3. Caractéristiques des animaux positifs

Nous avons établi une fiche de renseignements qui accompagnait les prélèvements, afin d'obtenir des informations sur les animaux prélevés. Grâce aux renseignements obtenus et insérés dans une base de données Excel. Nous avons pu étudier les caractéristiques des 69 animaux positifs, selon les données recueillies au cours de l'étude.
Par contre, nous avons un nombre important de données non précisées, à cause d'un manque d'informations sur les antécédents des animaux prélevés, surtout les animaux prélevés au niveau des abattoirs qui sont accompagnés d'un ordre d'abattage qui contient très peu de données sur l'animal et aucun renseignement concernant les signes cliniques.

a) Nombre d'animaux positifs par tranche d'âge

Le tableau suivant représente le nombre d'animaux positifs par tranche d'âge :

Tableau 5.14: Nombre d'animaux positifs par tranche d'âge

Age	Nombre d'animaux étudiés	Nombre d'animaux positifs	Pourcentage (%)
[2-4 ans]	74	32	**43,2%**
[5-7 ans]	61	27	**44,2%**
[8-10 ans]	8	3	**37,5%**
> 10 ans	2	0	**0,0%**
Indéterminé	16	7	**43,7%**

F exact = 0,734 ; p= 0,865*

** Nous avons utilisé le test de Fisher exact car les effectifs sont faibles, pour le calcul de ce test, nous avons assemblé les classes 8ans et plus.*

Le plus grand nombre d'animaux positifs se trouve dans la tranche d'âge de 2 à 7 ans, particulièrement entre 5 et 7 ans. Nous constatons que plus on avance dans l'âge plus le nombre d'animaux positifs diminue. Aucun animal positif n'est détecté chez animaux âgés de plus de 10 ans. Mais statistiquement la différence est non significative. L'âge ne semble pas influencer l'isolement des *Brucella*.

La littérature rapporte que la période de sensibilité maximale est atteinte après un développement complet des organes génitaux ; la brucellose est une maladie des animaux pubères ou adultes. Ces animaux peuvent rester infectés pendant toute leur vie, malgré la réponse immunitaire qu'ils développent. Il est d'observation courante que l'incidence de la brucellose augmente avec l'âge, en relation avec la vie sexuelle des animaux , plus l'animal vit longtemps dans un milieu infecté, plus grands sont les risques qu'il a de s'infecter (Acha & Szyfres, 2005 ; Ganière, 2004 ; Godfroid et al, 2003 ; Garin-Bastuji, 1993).

Nos résultats pourraient être expliqués par fait, qu'à un âge avancé l'animal atteint soit au stade de chronicité, où l'excrétion de la bactérie s'est arrêtée, donc très peu de chance d'isoler des *Brucella* à cette étape de la maladie ; puisque les *Brucella* sont excrétés durant les premiers stades de l'infection (Ganière, 2004 ; Comité des experts brucellose, 1986 ; Acha et al., 1989).

b) Nombre d'animaux positifs par race

Le tableau suivant représente le nombre d'animaux positifs pour chacune des races :

Tableau 5.15 : nombre d'animaux positifs par race.

Race	Nombre d'animaux étudiés	Nombre d'animaux positifs	Pourcentage (%)
Locale *	30	11	**36,7%**
Montbéliarde	28	10	**35,7%**
Holstein	42	18	**42,9%**
Brune des Alpes	5	4	**80,0%**
Frisonne	1	0	**0,0%**
Croisée	37	19	**51,3%**
Indéterminée	18	7	**38,9%**

**population locale.*

Nous remarquons que le taux de positivité le plus élevé est retrouvé chez les animaux croisés (51%), puis les animaux de race Holstein (43%), puis la population locale (37%) et la race

Montbéliarde (36%). La race Brune des Alpes présente un taux de 80%, mais l'effectif est très réduit.

Le secteur suivant représente la proportion d'animaux positifs pour chaque race sur la totalité des bovins positifs :

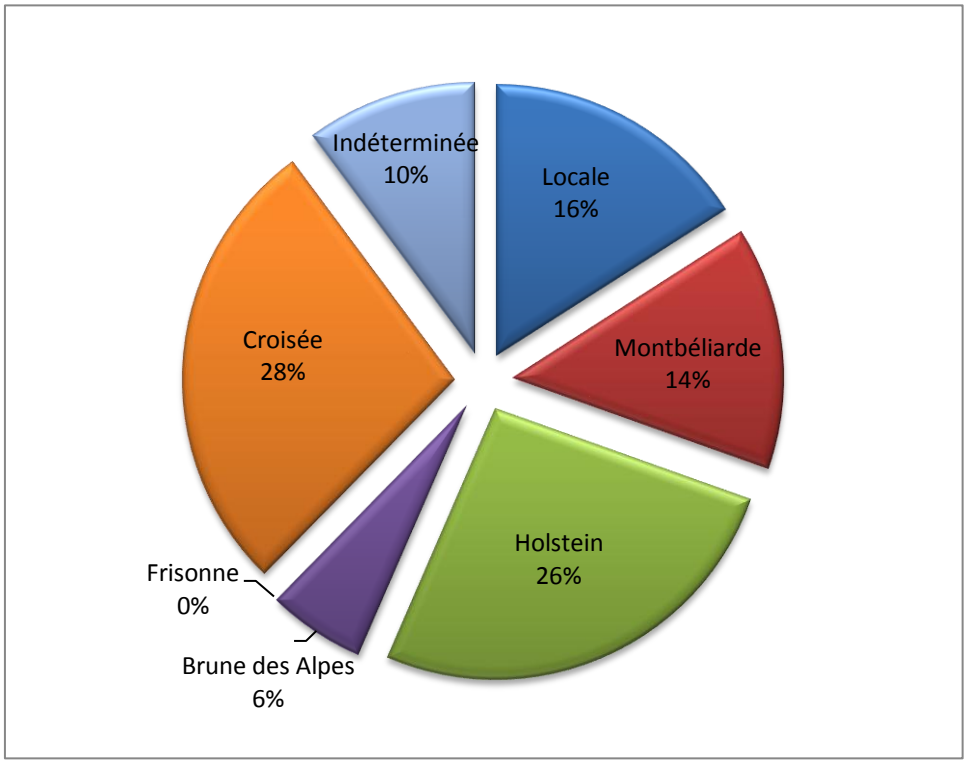


Figure 5.22: Répartition des animaux positifs selon la race.

Sur l'ensemble des bovins positifs, plus d'un quart sont des animaux croisés (28%) et un quart de race Holstein.

Nous n'avons pas pu calculer le Khi 2 pour les différentes races, car certains effectifs théoriques sont inferieur à 5. Il fallait donc regrouper les races en populations. Dans le tableau suivant, nous avons regroupé les animaux selon les populations importées, locale et croisée :

Tableau 5.16 : nombre d'animaux positifs selon l'origine de la race

Population	Nombre d'animaux étudiés	Nombre d'animaux positifs	Pourcentage (%)
Locale	30	11	**36,7%**
Importée	76	32	**42,1%**
Croisée	37	19	**51,3%**
Indéterminée	18	7	**38,9%**

X^2=1,69 ; p=0,6385

Statistiquement la différence n'est pas significative ($X^2=1,69$ - $p=0,6385$), mais nous constatons que le taux de positivité le plus élevé est retrouvé toujours chez les animaux croisés (51%), suivi des animaux de races importées (42%) puis en dernier les animaux de population locale (37%).

Le secteur suivant représente la proportion d'animaux positifs pour chaque population sur la totalité des bovins positifs :

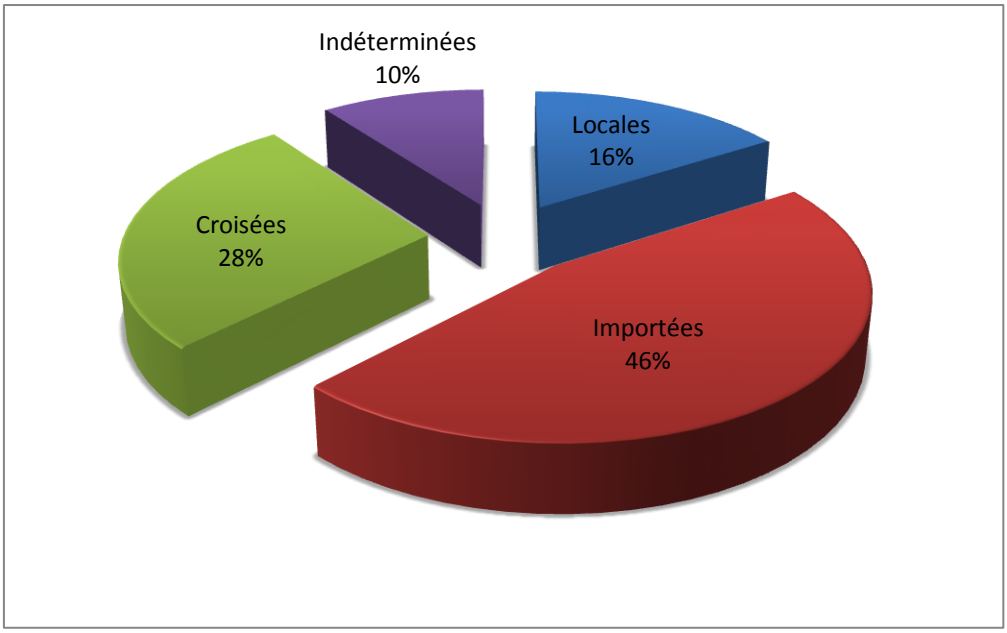


Figure 5.23: Répartition des animaux positifs selon les populations bovines.

Presque la moitié des animaux positifs sont des animaux de races importées (46%) et plus d'un quart sont des animaux croisés (28%). Mais là aussi, la différence est non significative, en effet, selon la littérature, il ne semble pas exister de races bovines plus résistantes que d'autres à l'infection brucellique (Godfroid et al., 2003).

c) Nombre d'animaux positifs par signes cliniques

Le tableau suivant représente le nombre d'animaux qui ont présenté des signes cliniques de brucellose :

Tableau 5.17: Nombre d'animaux positifs présentant des signes cliniques

Signes cliniques	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux positifs	Taux de positivité
Signes cliniques	43	21	48,8%
Aucun signe clinique	83	33	39,8%
Indéterminés	35	15	42,9%

Suite à l'analyse des données obtenues, 27% des animaux étudiés (43/161) ont présenté des signes cliniques tels que des avortements, des rétentions placentaires ou des arthrites.
Sur les animaux présentant des signes cliniques, la moitié (49%) étaient positifs en bactériologie, ce qui confirme que la cause était *Brucella*.

Sur les 161 bovins séropositifs étudiés, plus de la moitié (51,5%) n'ont présenté aucun signe clinique. Parmi eux, 40% (33/83) étaient positifs en bactériologie, ce qui représente un diagnostic de certitude, suggérant ainsi une forme inapparente de la brucellose.

En effet, la littérature rapporte une fréquence importante des formes inapparentes, 20 à 60% des vaches sérologiquement positives, sans symptômes de brucellose, éliminent le germe dans le colostrum et le lait (Ganière, 2004).

Les tableaux suivants représentent le nombre d'animaux positifs selon le signe clinique présenté :

i) Avortements

Tableau 5.18: Nombre d'animaux positifs présentant des avortements.

Avortements	Nombre d'animaux étudiés	Nombre d'animaux positifs	Pourcentage (%)
Oui	41	18	**43,9%**
Non	79	35	**44,3%**
NP*	40	16	**40,0%**

* *Non Précisé.*

Sur les 160 femelles étudiées, 41 ont présenté un avortement, ce qui représente plus d'un quart des vaches étudiées (25,6%). Parmi celles-ci, 18 étaient positives en bactériologie (44%), donc des femelles brucelliques et l'avortement était dû à *Brucella*. Ce qui rejoint la littérature qui

rapporte que l'avortement constitue le symptôme cardinale de la brucellose bovine et que les animaux les plus sensible sont les femelles gestantes (Ganière, 2004, Godfroid et al., 2003).

Il faut souligner que parmi les 41 femelles présentant un avortement, 4 vaches ont présenté simultanément une rétention placentaire et une vache a présenté une arthrite. En général, l'avortement se produit pendant la seconde moitié de la gestation (du 5ème au 7ème mois), souvent avec rétention placentaire (Megid et al., 2010).

Notons que 44% des femelles qui ne présentaient pas d'avortement, étaient positives en bactériologie. En effet, la brucellose bovine est une infection chronique. Bien qu'une vache malade n'avorte, en général, qu'une fois, elle reste infectée et peut excréter des bactéries dans le lait et les sécrétions du tractus génital au cours d'un vêlage ultérieur, apparemment normal (Megid et al., 2010).

On relève 40 femelles étudiées, sur lesquelles nous n'avons pas eu de données concernant l'avortement.

ii) Rétention placentaire

Tableau 5.19: Nombre d'animaux positifs présentant une rétention placentaire

Rétention placentaire	Nombre d'animaux étudiés	Nombre d'animaux positifs	Pourcentage (%)
Oui	6	2	**33,3%**
Non	88	35	**39,7%**
NP*	66	32	**48,5%**

** Non Précisé.*

Sur les 160 femelles étudiées, 6 ont présenté une rétention placentaire (3,75%), dont 4 étaient associées à des avortements.

Sur les six femelles présentant une rétention placentaire, des *Brucella* n'ont été isolées que chez deux femelles, une qui présentait cliniquement une rétention placentaire seule et une autre qui présentait une rétention placentaire associée à un avortement.

Notons que 40% des femelles qui ne présentaient pas de rétention placentaire étaient positives en bactériologie.

La littérature rapporte que la non délivrance est fréquente (surtout lorsque l'avortement survient à partir du 6eme à 7eme mois) en raison de la solidité des adhérences utéro-choriales et de la fragilité des enveloppes (Ganière, 2004). Il peut y avoir une rétention placentaire après l'avortement ou la mise bas (Manninger et al., 1959), fréquemment, même en absence d'avortement (Morgan et al., 1979).

Nous n'avions pas de données sur 66 femelles étudiées, dont 48,5% étaient positives.

iii) Arthrite

Tableau 5.20: Nombre d'animaux positifs présentant une arthrite

Arthrite	Nombre d'animaux étudiés	Nombre d'animaux positifs	Pourcentage (%)
Oui	1	1	**100%**
Non	99	44	**44,4%**
NP*	61	24	**39,3%**

** Non Précisé.*

Sur les 161 bovins étudiés, nous avons observé une arthrite sur une seule vache (0,62%), qui présentait simultanément un avortement et qui s'est avérée positive en bactériologie. Nous constatons que 99 bovins ne présentaient pas d'arthrite, 44% d'entre eux étaient positifs en bactériologie.

Parmi les autres symptômes de l'infection brucellique, il faut noter l'arthrite et des hygromas uni ou bilatéraux, que l'on observe même chez des vaches n'ayant jamais avorté (Ganiere, 2004). L'inflammation se développe que dans certaines articulations, surtout le carpe chez 66% des animaux lors d'infection chronique (Acha and Szyfres, 2005; Godfroid et al., 2003) Manninger et al., 1959).

Relevons que nous manquions de données concernant ce symptôme pour 61 animaux étudiés.

Sur les 161 bovins brucelliques étudiés dans les 4 régions, nous avons isolé des Brucella sur 69 animaux issus de 40 foyers, ce qui représente un taux de positivité de 43%. Le taux d'animaux positifs le plus élevé est observé dans la région Ouest (67%). Notons que le nombre le plus important des animaux positifs se situe dans la tranche d'âge de 2 à 7 ans et sont souvent de race croisée.

Sur le plan clinique, 27% des animaux étudiés ont présenté des signes cliniques tels que des avortements, des rétentions placentaires ou des arthrites, dont la moitié était positifs en bactériologie.
Plus de la moitié des bovins étudiés n'ont pas présenté de signes cliniques, mais 40% d'entre eux étaient positifs en bactériologie, suggérant une forme inapparente de la brucellose. Les avortements ont présenté la proportion la plus importante des signes cliniques, parfois associés à une rétention placentaire ou à une arthrite.

4. Nombre de prélèvements positifs

Au cours de notre étude, nous avons réalisé 298 prélèvements, sur lesquels, nous avons effectué une recherche bactériologique de *Brucella* selon la norme AFNOR NF U 47-105. Le tableau 5.21 représente le nombre de prélèvement positifs à partir d'animaux positifs en bactériologie.

Tableau 5.21: Nombre de prélèvements positifs sur les animaux positifs dans chaque région et wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre animaux positifs	Nombre prélèvements positifs
Centre	Alger	5	5
	Blida	7	8
	Médéa	1	1
	M'sila	0	0
	Bordj Bou Arreridj	0	0
	Tizi Ouzou	6	11
	Béjaïa	21	34
Total centre		**40**	**59**
Est	Jijel	9	12
	El Taref	3	3
Total Est		**12**	**15**
Ouest	Tlemcen	11	16
	Oran	3	3
Total Ouest		**14**	**19**
Sud	Laghouat	3	4
	Ouargla	0	0
Total Sud		**3**	**4**
Total Algérie		**69**	**97**

Nous avons isolé des souches de *Brucella* à partir de **97** prélèvements issus des 69 bovins positifs en bactériologie.

Le tableau 5.22 et fig. 5.24 détaille le nombre de prélèvements positifs par rapport à l'ensemble des prélèvements réalisés au cours de cette étude :

Tableau 5.22 : Nombre de prélèvements positifs par wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre prélèvements	Nombre prélèvements positifs	Nombre prélèvements négatifs	Pourcentage (%)
Centre	Alger	8	5	3	62,5
	Blida	28	8	20	28,6
	Médéa	4	1	3	25,0
	M'sila	6	0	6	0,0
	Bordj Bou Arreridj	3	0	3	0,0
	Tizi Ouzou	32	11	21	34,4
	Béjaïa	79	34	45	43,0
Total centre		**160**	**59**	**101**	**36,9%**
Est	Jijel	50	12	38	24,0
	El Taref	23	3	20	13,0
Total Est		**73**	**15**	**58**	**20,5%**
Ouest	Tlemcen	39	16	23	41,0
	Oran	3	3	0	100,0
Total Ouest		**42**	**19**	**23**	**45,2%**
Sud	Laghouat	22	4	18	18,2
	Ouargla	1	0	1	0,0
Total Sud		**23**	**4**	**19**	**17,4%**
Total Algérie		**298**	**97**	**201**	**32,5%**

Sur les 298 prélèvements réalisés, nous avons isolé des *Brucella* à partir de 97 prélèvements, ce qui représente un taux de positivité de **32,5%** avec CI 95% : [27,2 – 37,9] %.

Ce taux d'isolement est largement supérieur a ceux retrouvés dans deux autres études : en Algérie par Aggad et al. 2006 (1/39 prélèvements de lait) ; au Nigeria par Ocholi et al. 2004 (25/830 prélèvements) ; mais inferieur à celui retrouvé en Egypte par Hamdy et al. 2002 (24/52 prélèvements de lait), qui ont utilisé la même méthode d'isolement bactériologique (Alton et al., 1988). Notons que 201 prélèvements étaient négatifs en bactériologie, cela peut s'expliquer par le stade de l'infection des vaches qui dans cette étude n'est pas connue. Les vaches ont été diagnostiqués comme positive en utilisant des méthodes sérologiques de routine et donc avait évidemment une réponse immunitaire. Par conséquent, il est peu probable que les animaux étaient dans les premiers stades de l'infection lors du prélèvement. La possibilité

demeure que certains des animaux peuvent avoir expulsé les bactéries avant l'échantillonnage. Il est possible aussi que les bactéries étaient présentes à de très faibles quantités.
Il est probable qu'un faible nombre de bactéries était présent dans les ganglions lymphatiques et qu'il avait été par intermittence secrété dans le lait. Il est admis dans la littérature que l'excrétion des *Brucella* dans le lait est intermittente. Cette excrétion est transitoire (souvent limitée à quelques jours après la mise-bas) et discrète dans l'espèce bovine (surtout importante après un avortement) (Ganière, 2004). Ainsi, le stade de l'infection au cours de laquelle un échantillon est prélevé pourrait avoir un impact majeur sur la détection bactérienne.

a) Nombre de prélèvements positifs par région

Le tableau 5.23 résume le nombre de prélèvements positifs par région étudiée :

Tableau 5.23 : Nombre de prélèvements positifs par région

Régions	Nombre prélèvements	Nombre prélèvements positifs	Nombre prélèvements négatifs	Pourcentage
Centre	160	59	101	**36,9%**
Est	73	15	58	**20,5%**
Ouest	42	19	23	**45,2%**
Sud	23	4	19	**17,4%**
Total Algérie	**298**	**97**	**201**	**32,5%**

$X^2 = 11,64$; $p = 0,0087$

Statistiquement la différence est significative (*$X^2 = 11,64$ – $p = 0,0087$*), le pourcentage de positivité le plus élevé est retrouvé à l'Ouest (45%) et le plus bas au Sud (17%). Cela rejoint le nombre d'animaux positifs qui est le plus élevé à l'Ouest.

La carte suivante représente le nombre de prélèvements positifs par wilaya étudiée :

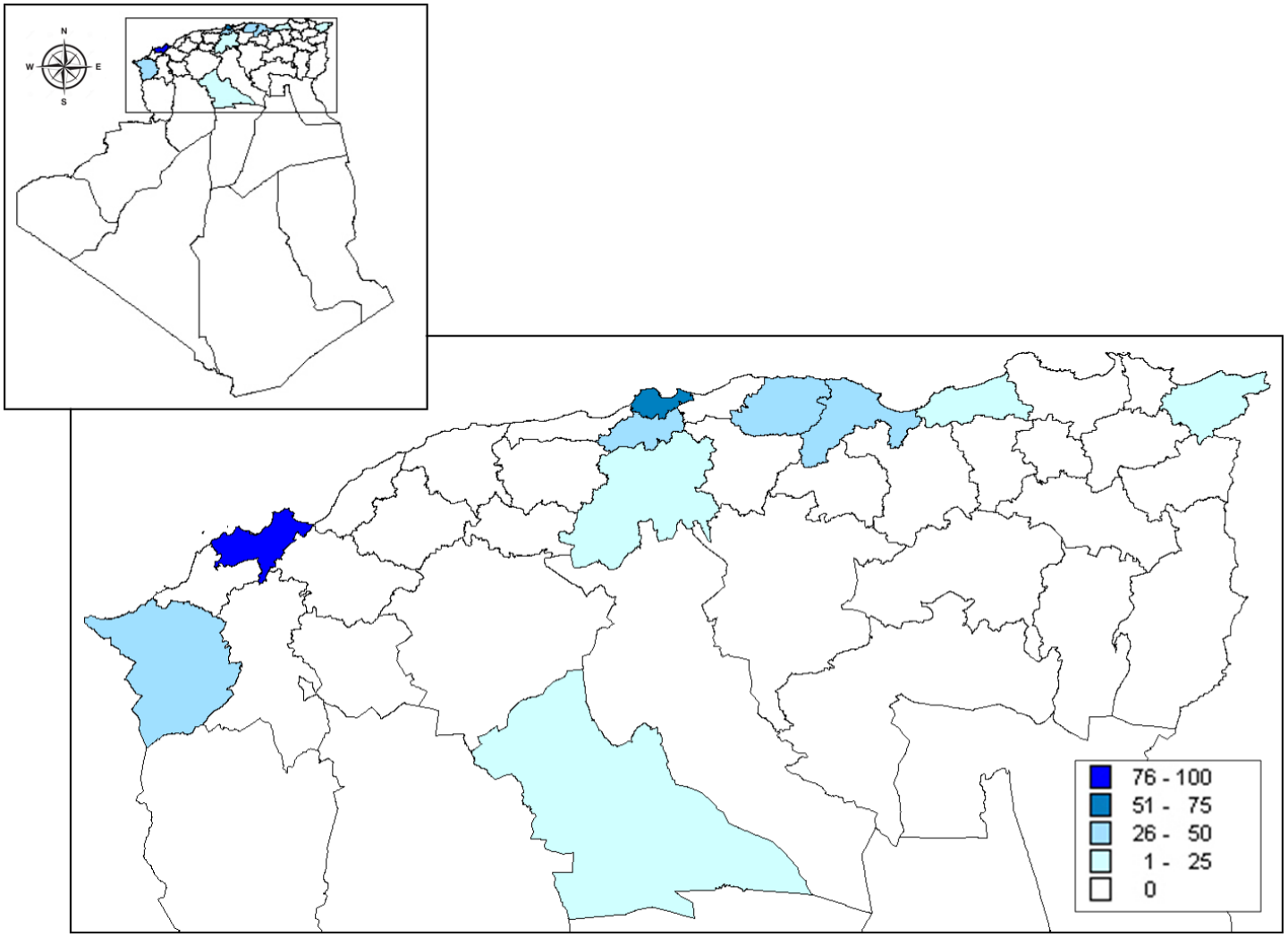


Figure 5.24: Nombre de prélèvements positifs par wilaya.

b) Nombre de prélèvements positifs par type de prélèvement

Nous avons étudié le nombre de prélèvements positifs selon les 4 types de prélèvements effectués.

Tableau 5.24 : Nombre de prélèvements positifs selon les types de prélèvements

Type de prélèvements	Nombre de prélèvements	Nombre de prélèvements positifs	Pourcentage (%)
Lait	109	35	**32,1%**
Ganglions rétro-pharyngiens	97	18	**18,5%**
Ganglions rétro-mammaires	89	41	**46,0%**
Ganglions inguinaux	3	3	**100%**

X² =16,18 ; p = 0,0003*

** X^2 calculé sans prendre en considération les ganglions inguinaux (effectif < 5).*

Statistiquement la différence est significative (*X² =16,18 - p = 0,0003*). Le taux de positivité varierait en fonction du type de prélèvements : les ganglions rétro-mammaires (46%), le lait (32%) et les ganglions rétropharyngiens (18,5 %). Notons que trois prélèvements de ganglions inguinaux ont été effectués et sont tous retrouvés positifs.
Le taux le plus élevé pour les ganglions rétro-mammaires et le plus bas pour les ganglions rétropharyngiens. Ce qui suggèrerait que nous avons plus de chance d'isoler des *Brucella* dans les ganglions rétro-mammaires et dans le lait que dans les ganglions rétropharyngiens.
Ceci confirme l'étude menée par Marin et al. 1996 chez les petits ruminants avec les taux de positivité de 69,2% ; 60,9% et 37,4% pour les nœuds lymphatique mammaires ; le lait et les nœuds lymphatique crâniens respectivement, rapportant que la mamelle (ganglions mammaires et lait) est le plus fréquemment infectée. Ainsi que les résultats obtenus par O'Leary et al 2006 qui suggèrent que la bactérie peut être facilement détectable dans les tissus lymphatiques.

D'après la littérature, une fois la période aiguë de la maladie est passée, les animaux peuvent présenter peu ou pas de symptômes, et les *Brucella* peuvent se localiser chroniquement dans les ganglions lymphatiques mammaires et la glande mammaire chez 80% des animaux infectés; ainsi, les animaux continuent à sécréter l'agent pathogène dans leurs fluides corporels (Leal-Klevezas et al., 1995).

Les macrophages des glandes mammaires peuvent fournir un environnement intracellulaire favorable pour la persistance de *B. abortus* dans la glande mammaire des vaches infectées de façon chronique (Megid et al., 2010).

Ainsi les ganglions mammaires et le lait semblent être les prélèvements de choix pour l'isolement des *Brucella*.

En contre partie, le fait qu'un tiers des prélèvements de lait et presque la moitié des ganglions mammaires contiennent des *Brucella*, est inquiétant pour la santé publique, vu les habitudes alimentaires de la population qui apprécie la consommation de lait cru de vache. Un constat similaire a été fait dans une étude au Nigeria où 48% du lait contenait des *Brucella* (Ocholi et al., 2004).

i) Prélèvements de lait

Sur les 298 prélèvements réalisés au cours de notre étude, 109 prélèvements de lait ont été effectués. Le tableau suivant représente le taux de prélèvements de lait positifs :

Tableau 5.25 : Nombre de prélèvements de lait positifs par wilaya

Régions	Wilayas	Nombre de laits prélevés	Nombre de laits positifs	Pourcentage (%)
Centre	Alger	8	5	62,5
	Blida	23	6	26,0
	Médéa	4	1	25,0
	M'sila	6	0	0,0
	Bordj Bou Arreridj	3	0	0,0
	Tizi Ouzou	14	3	21,4
	Béjaïa	23	9	39,1
Total centre		**81**	**24**	**29,6%**
Est	Jijel	5	2	40,0
	El Taref	10	3	30,0
Total Est		**15**	**5**	**33,3%**
Ouest	Tlemcen	5	3	60,0
	Oran	3	3	100,0
Total Ouest		**8**	**6**	**75,0%**
Sud	Laghouat	4	0	0,0
	Ouargla	1	0	0,0
Total Sud		**5**	**0**	**0,0%**
Total Algérie		**109**	**35**	**32,1%**

Sur les 109 prélèvements de lait réalisés, nous avons isolé des *Brucella* à partir de 35 laits, ce qui représente un taux de **32%** avec CI 95% : ⌈23,3 – 40,9] %.

Le Tableau 5.26 résume le nombre de prélèvements de lait positifs par région :

Tableau 5.26 : Nombre de prélèvements de lait positifs par région.

Régions	Nombre de laits prélevés	Nombre de laits positifs	Pourcentage (%)
Centre	81	24	29,6
Est	15	5	33,3
Ouest	8	6	75,0
Sud	5	0	0,0
Total Algérie	**109**	**35**	**32,1**

Notons des différences entre les régions étudiées, Centre (29,6 %), Est (33,3 %), Ouest (75%), Sud (0%), mais le test du X^2 ne peut être réalisé du fait de l'insuffisance des effectifs.

ii) Prélèvements de ganglions

Sur les 298 prélèvements effectués lors de cette étude, 189 prélèvements étaient des ganglions (rétro-pharyngiens et rétro-mammaires). Le tableau 12 représente le taux de ganglions positifs :

Tableau 5.27 : Nombre de prélèvements de ganglions positifs par wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre de ganglions prélevés	Nombre de ganglions positifs	Pourcentage (%)
Centre	Alger	0	0	0,0
	Blida	5	2	40,0
	Médéa	0	0	0,0
	M'sila	0	0	0,0
	Bordj Bou Arreridj	0	0	0,0
	Tizi Ouzou	18	8	44,4
	Béjaïa	56	25	44,6
Total centre		**79**	**35**	**44,3%**
Est	Jijel	45	10	22,2
	El Taref	13	0	0,0
Total Est		**58**	**10**	**17,2%**
Ouest	Tlemcen	34	13	38,2
	Oran	0	0	0,0
Total Ouest		**34**	**13**	**38,2%**
Sud	Laghouat	18	4	22,2
	Ouargla	0	0	0,0
Total Sud		**18**	**4**	**22,2%**
Total Algérie		**189**	**62**	**32,8%**

Sur les 189 prélèvements de ganglions réalisés, nous avons isolé des *Brucella* à partir de 62 ganglions, ce qui représente un taux de **33%** avec CI 95% : ⌈26,1 – 39,5]%.

Le Tableau 5.28 résume le nombre de prélèvements de ganglions positifs par région étudiée :

Tableau 5.28 : Nombre de prélèvements de ganglions positifs par région

Régions	Nombre de ganglions prélevés	Nombre de ganglions positifs	Pourcentage (%)
Centre	79	35	**44,3%**
Est	58	10	**17,2%**
Ouest	34	13	**38,4%**
Sud	18	4	**22,2%**
Total Algérie	**189**	**62**	**32,8%**

X^2 = 12,48 ; p = 0,0059

La différence est significative ($X^2 = 12,48 – p = 0,0059$), le taux de positivité est plus important au niveau de la région centre avec 44,3 %. Le taux le plus bas est observé au niveau de la région Est avec 17,2 %.

❖ **Prélèvements de ganglions rétro-pharyngiens**

Sur les 189 ganglions prélevés, 97 étaient des ganglions rétro-pharyngiens. Le tableau 5.29 détaille le nombre de ganglions rétro-pharyngiens positifs :

Tableau 5.29: Nombre de ganglions rétro-pharyngiens positifs par wilaya

Régions	Wilayas	Nombre de ganglions rétro-pharyngiens	Nombre de ganglions rétro-pharyngiens positifs	Pourcentage (%)
Centre	Alger	0	0	0,0
	Blida	2	0	0,0
	Médéa	0	0	0,0
	M'sila	0	0	0,0
	Bordj Bou Arreridj	0	0	0,0
	Tizi Ouzou	9	3	33,3
	Béjaïa	30	9	30,0%
Total centre		**41**	**12**	**29,2%**
Est	Jijel	22	0	0,0
	El Taref	7	0	0,0
Total Est		**29**	**0**	0,0%
Ouest	Tlemcen	18	5	27,8
	Oran	0	0	0,0
Total Ouest		**18**	**5**	**27,8%**
Sud	Laghouat	9	1	11,1
	Ouargla	0	0	0,0
Total Sud		**9**	**1**	**11,1%**
Total Algérie		**97**	**18**	**18,5%**

Sur les 97 ganglions rétro-pharyngiens prélevés, nous avons isolé des souches de *Brucella* à partir de 18 ganglions, ce qui représente un taux de positivité de **18,5%,** avec CI 95% : [10,8 – 26,3]%.

Tableau 5.30 résume le nombre de ganglions rétro-pharyngiens positifs par région étudiée :

Tableau 5.30 : Nombre de ganglions rétro-pharyngiens positifs par région.

Régions	Nombre de ganglions rétropharyngiens	Nombre de ganglions rétropharyngiens positifs	Pourcentage (%)
Centre	41	12	**29,3%**
Est	29	0	**0,0%**
Ouest	18	5	**27,8%**
Sud	9	1	**11,1%**
Total Algérie	**97**	**18**	**18,5%**

Notons que nous n'avons pas isolé de *Brucella* à partir des ganglions rétro-pharyngiens de la région Est et une seule souche a été isolée dans le Sud. Dans le Centre et l'Ouest les taux de ganglions rétropharyngiens positifs sont très proches 29% et 28% respectivement.

- **Prélèvements de ganglions rétro-mammaires**

Sur les 189 ganglions prélevés, 89 étaient des ganglions rétro-mammaires. Le tableau 5.31 détaille le nombre de ganglions rétro-mammaires positifs :

Tableau 5.31 : Nombre de ganglions rétro-mammaires positifs par wilaya.

Régions	Wilayas	Nombre de ganglions rétro-mammaires	Nombre de ganglions retro-mammaires positifs	Pourcentage (%)
Centre	Alger	0	0	0,0
	Blida	2	1	50,0
	Médéa	0	0	0,0
	M'sila	0	0	0,0
	Bordj Bou Arreridj	0	0	0,0
	Tizi Ouzou	9	5	55,5
	Béjaïa	25	15	60,0
Total centre		**36**	**21**	**58,3%**
Est	Jijel	22	9	40,9
	El Taref	6	0	0,0
Total Est		**28**	**9**	**32,1%**
Ouest	Tlemcen	16	8	50,0
	Oran	0	0	0,0
Total Ouest		**16**	**8**	**50,0%**
Sud	Laghouat	9	3	33,3
	Ouargla	0	0	0,0
Total Sud		**9**	**3**	**33,3%**
Total Algérie		**89**	**41**	**46,0%**

Sur les 89 ganglions rétro-mammaires prélevés, nous avons isolé des souches de *Brucella* dans 41 ganglions, ce qui représente un taux de positivité de **46%** avec CI 95% : [35,7 – 56,4] %.

Tableau 5.32 résume le nombre de ganglions rétro-mammaires positifs par région étudiée :

Tableau 5.32: Nombre de ganglions rétro-mammaires positifs par région

Régions	Nombre de ganglions rétro-mammaires	Nombre de ganglions retro-mammaires positifs	Pourcentage (%)
Centre	**36**	**21**	**58,3%**
Est	**28**	**9**	**32,1%**
Ouest	**16**	**8**	**50,0%**
Sud	**9**	**3**	**33,3%**
Total Algérie	**89**	**41**	**46,0%**

vX² = 5,05 ; p = 0,08* ****X² calculé en regroupant les régions Est et Sud***

La différence est significative (*vX² = 5,05 ; p = 0,08*), le taux de positivité est plus élevé dans la région Centre (58%) suivi de la région Ouest (50%).

c) Type de prélèvements positifs selon l'âge

Nous nous sommes intéressé d'étudier la variation du taux de positivité du type de prélèvements en fonction de l'âge de l'animal dans le tableau suivant :

Tableau 5.33 : Type de prélèvements positifs en fonction de l'âge de l'animal

Age	Type de prélèvement				TOTAL
	Lait	Ganglions rétropharyngiens	Ganglions rétromammaires	Ganglions inguinaux	
[2-4ans]	17 *(37,8 %)*	10 *(22,2%)*	18 ***(40,0%)***	0 *(0%)*	45
[5-7ans]	11 *(28,9%)*	6 *(15,8%)*	18 ***(47,4%)***	3 (7,9%)	38
[8-10ans]	2 *(40,0%)*	1 *(20,0%)*	2 ***(40,0%)***	0 *(0%)*	5
>10 ans	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0%)*	0
NP*	5 *(55,6%)*	1 *(11,1%)*	3 *(33,3%)*	0 *(0%)*	9

** Non Précisé.*

Nous constatons que quelque soit l'âge de l'animal, nous retrouvons plus de *Brucella* au niveau des ganglions rétro-mammaires. L'âge ne semble pas influencer sur l'affinité des *Brucella* à un site de prélèvement.

Sur les 298 prélèvements réalisés, nous avons isolé des Brucella à partir de 97 prélèvements, ce qui représente un taux de 32,5%. Le taux de positivité le plus élevé est retrouvé à l'Ouest (45%). Les ganglions rétro-mammaires avec taux de positivité de 46% et le lait avec 32% semblent être les prélèvements de choix pour l'isolement des Brucella. L'âge ne semble pas influencer sur l'affinité des Brucella à un site de prélèvement.

5. Nombre de souches de *Brucella* isolées

Sur les 298 prélèvements effectués sur les 161 bovins, nous avons pu isoler et identifier **97** souches de *Brucella*. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant selon les régions et les wilayas étudiées.

Tableau 5.34 : Nombre de souches *Brucella* isolées par région et par wilaya

Régions	Wilayas	Nombre Animaux positifs	Nombre de souches
Centre	Alger	5	5
	Blida	7	8
	Médéa	1	1
	M'sila	0	0
	Bordj Bou Arreridj	0	0
	Tizi Ouzou	6	11
	Béjaïa	21	34
Total centre		40	59
Est	Jijel	9	12
	El Taref	3	3
Total Est		12	15
Ouest	Tlemcen	11	16
	Oran	3	3
Total Ouest		14	19
Sud	Laghouat	3	4
	Ouargla	0	0
Total Sud		3	4
Total Algérie		69	97

Sur les 69 animaux positifs en bactériologie, nous avons isolé **97** souches de *Brucella*. Il faut noter que 86 souches de *Brucella* ont été isolées au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie et 11 souches au niveau du laboratoire de référence des Brucelloses (ANSES).

Les 11 souches identifiées à l'ANSES, ont été isolées à partir des prélèvements de ganglions, que nous avons retrouvé négatif à l'IPA. Cela peut s'expliquer par la méthode d'isolement utilisée pour les ganglions, qui sont au préalable broyés par un stomasher, appareil dont nous disposions pas à l'IPA. Le broyage des ganglions est préconisé, car augmente la sensibilité de la méthode d'isolement (Norme AFNOR NF U 47-105).

4. Nombre de souches *Brucella* isolées par animal

Les animaux ont fait l'objet de 3 types de prélèvements (lait, ganglions rétro-pharyngiens et ganglions rétro-mammaires). Chez certains animaux étudiés, le prélèvement de ganglions inguinaux a été ajouté. Par conséquent, nous avons isolé de 0 à 3 souches par animal (voir tableau 5.35).

Tableau 5.35 : Nombre de souches *Brucella* isolées par animal.

	Nombre de souches isolées par animal			
	0 souche	**1 souche**	**2 souches**	**3 souches**
Nombre de bovins	98	43	24	2
Pourcentage (%)	60,8%	26,7%	14,9%	1,2%

Selon la porte d'entrée de la bactérie dans l'organisme de l'animal, les souches ont pu être isolées d'un ou plusieurs prélèvements. Nous avons isolé une souche chez 27%, deux souches chez 15% et trois souches chez 1% des bovins étudiés.

Il faut noter que nous avons isolé au moins une souche chez 43% des bovins étudiés et deux souches ou plus chez 16% de bovins prélevés.

Nous nous sommes intéressés à la relation qui pourrait exister entre le nombre de souches isolées et certaines caractéristiques de l'animal :

5. Nombre de souches *Brucella* isolées selon la race de l'animal

Les 97 souches ont été isolées de bovins de différentes races, le tableau suivant représente le pourcentage dans les différentes races :

Tableau 5.36: Nombre de souches *Brucella* isolées par race

Races	**Nombre de souches**	**Pourcentage (%)**
Locale*	15	**15,5%**
Montbéliarde	14	**14,4%**
Holstein	25	**25,8%**
Brune des Alpes	6	**6,2%**
Frisonne	0	**0,0%**
Croisée	28	**28,9%**
Indéterminée	9	**9,3%**

** population locale*

Nous observons que le plus grand nombre de souches (29%) a été isolé chez les bovins croisés, puis les bovins de race Holstein (26%), puis locale (15,5%).

6. Nombre de souches *Brucella* isolées selon l'âge de l'animal

Les animaux positifs étaient âgés de 2 à 10 ans, nous avons étudié le nombre de souches isolées selon les tranches d'âge :

Tableau 5.37: Nombre de souches *Brucella* isolées par tranche d'âge.

Age	Nombre de souches isolées	Pourcentage (%)
[2-4 ans]	45	46,4%
[5-7 ans]	38	39,2%
[8-10 ans]	5	5,1%
> 10 ans	0	0,0%
Indéterminé	9	9,3%

Presque la moitié des souches (46%) ont été isolées chez des bovins âgés entre 2 et 4 ans. Il faut noter que la majorité des animaux étudiés appartiennent à cette tranche d'âge. Tranche d'âge qui correspond à la pleine reproduction, donc les plus sensibles à la brucellose (essentiellement les femelles gestantes). En effet, la période de sensibilité maximale est atteinte après un développement complet des organes génitaux: la brucellose est une maladie des animaux pubères ou adultes. La gestation est un facteur important de sensibilité. On estime par exemple qu'une vache adulte contaminée hors gestation a la possibilité dans prés de 50% des cas de ne développer qu'une infection de courte durée spontanément curable (Ganière, 2004).

Nous remarquons que plus on avance dans l'âge, moins de souches sont isolées. Cela peut s'expliquer par le fait que la brucellose serait sous forme chronique à un âge avancé, ce qui diminue les chances d'isoler une souche à ce stade de la maladie.

7. Nombre de souches *Brucella* isolées par type de prélèvement

Nous avons représenté dans le secteur suivant, le nombre de souches isolées selon les trois types de prélèvements effectués :

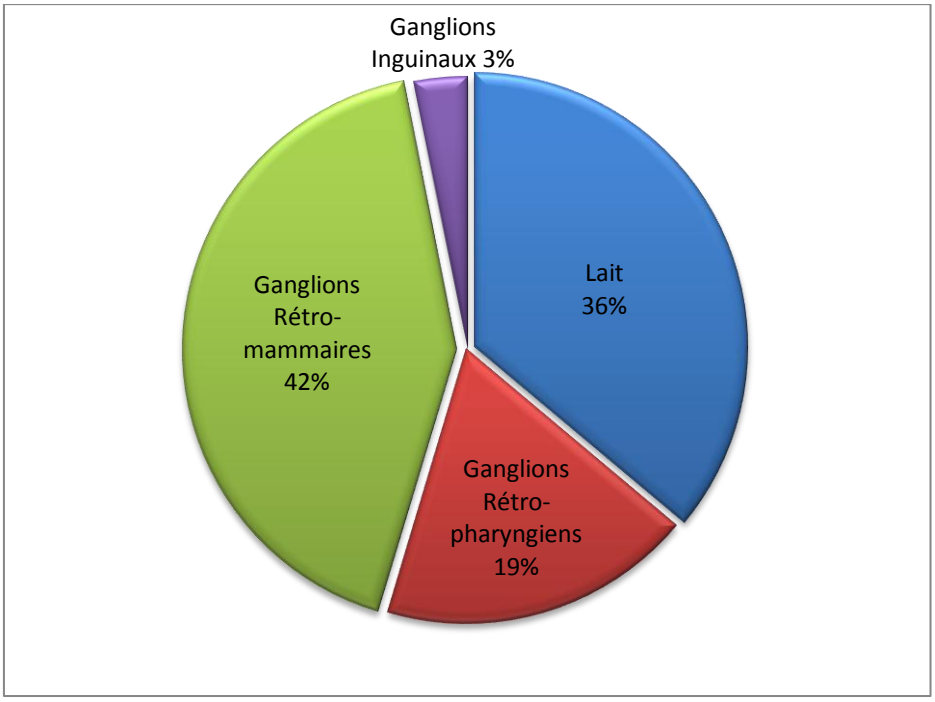


Figure 5.25: Nombre de souches *Brucella* isolées par type de prélèvements

La proportion de souches isolées des ganglions rétro-mammaires est la plus élevée (42%) suivie du lait (36%), puis des ganglions rétro-pharyngiens (19%). Presque la moitié des souches identifiées ont été isolées des ganglions rétro-mammaire et plus d'un tiers isolées du lait.

8. Nombre de souches *Brucella* isolées par signe clinique

Tableau 5.38: Nombre de souches *Brucella* isolées par signe clinique

Signes cliniques	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux positifs	Nombre de souches	Pourcentage (%)
Avortement	36	18	23	**23,7%**
Rétention placentaire	2	1	1	**1,0%**
Avortement + rétention placentaire	4	1	2	**2,1%**
Arthrite	0	0	0	**0,0%**
Avortement + Arthrite	1	1	1	**1,0%**
Aucun signe clinique	83	33	46	**47,4%**
Indéterminés	35	15	24	**24,7%**

Sur les 161 animaux étudiés, 43 bovins ont présenté des signes cliniques de brucellose, sur lesquels nous avons isolé 27 souches de *Brucella*. Parmi lesquelles, 23 souches ont été isolées sur 18 vaches présentant des avortements, une souche sur une vache présentant une rétention placentaire seule, deux souches sur une vache présentant simultanément un avortement et une rétention placentaire et une souche sur un bovin présentant une arthrite associée à un avortement.

Sur les 83 bovins qui ne présentaient aucun signe clinique, nous avons isolé 46 souches sur 33 vaches. En effet, une quantité importante de *Brucella* est excrétée par la femelle infectée par les voies génitales et mammaires (lait et colostrum), y compris dans les formes asymptomatiques (GDS, 2003). Tout animal infecté, malade ou apparemment sain, constitue une source potentielle de *Brucella*. Il peut en outre rester porteur de germe et contagieux durant toute son existence (Ganière, 2004).

Nous constatons que la moitié des souches *Brucella* (47%) sont isolées chez les animaux qui ne présentent aucun signe clinique ou asymptomatiques, et un quart (24%) chez les animaux qui présentent un avortement. Il est aussi intéressant de souligner que toutes les souches des femelles qui ont présenté un avortement ont été isolées soit du lait et/ ou des ganglions mammaires, ce qui implique une infection simultanée de l'utérus et de la mamelle. En effet, il est rapporté que 70-80% des vaches éliminent le germe dans le colostrum et le lait après un avortement (Ganière, 2004).

6. Les espèces de *Brucella* identifiées

Suite à la recherche bactériologique des *Brucella*, les souches isolées des différents prélèvements et des différentes régions, ont pu être typée en espèces de *Brucella* selon Alton et al. 1988. Le secteur suivant représente la proportion de chaque espèce *Brucella* isolée dans les quatre régions d'Algérie :

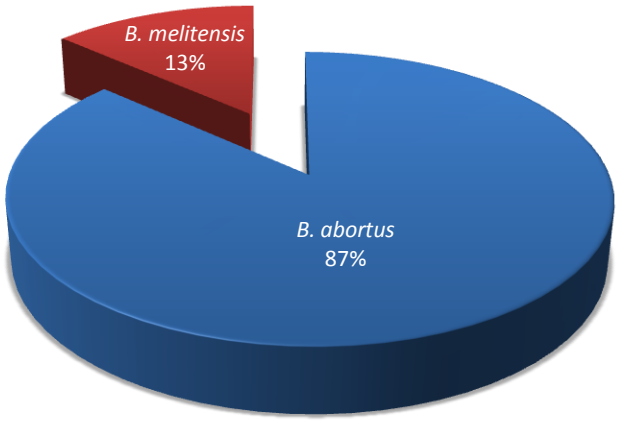


Figure 5.26: Proportion des espèces de *Brucella* isolées

Sur les 97 souches de *Brucella* isolées dans notre étude, nous avons typé deux espèces de *Brucella* :

- 84 souches de *B. abortus*, ce qui représente 87% avec CI 95% : [79,8 – 93,4] % ;
- 13 souches de *B. melitensis*, ce qui représente 13% avec CI 95% : [6,6 – 20,2] %.

B. abortus semble être l'espèce dominante chez les bovins étudiés. En effet, cette espèce est le principal agent de la brucellose bovine. Pourtant, c'est la première fois qu'elle était isolée dans notre pays. Notre travail constitue la première étude qui rapporte cette espèce en Algérie.

B. abortus a été isolée dans les pays voisins, en effet, au Maroc, *B. abortus* a déjà été isolé chez les bovins, depuis les années 70 (Taoudi et al., 1984). En Tunisie, on rapporte l'isolement de *B. abortus* depuis les années 80 (Chaabani, 1995).

Les bovins peuvent aussi être infectés par *B. melitensis*, comme nos résultats l'indiquent. Une souche brucellique hétérologue peut provoquer une maladie plus éphémère que celle causée par *B. abortus* (Acha and Szyfres, 2005), ce qui explique le taux de *B. melitensis* retrouvé chez les bovins de notre étude. Cependant, ces infections croisées représentent une sérieuse menace pour la santé publique.

La littérature rapporte que les bovins peuvent être infectés par *B. melitensis* quand ils partagent les mêmes pâturages et les mêmes installations que des caprins ou ovins infectés (Godfroid et al., 2003). Mais nous ne possédons pas cette information concernant les bovins étudiés.

La seule étude algérienne antérieure réalisée chez les bovins, rapporte l'isolement de *B. melitensis* chez une vache (Aggad and Boukraa, 2006).

7. Les biovars de *Brucella* identifiés

L'identification des souches isolées a pu être effectuée jusqu'au biotypage du biovar pour 77 souches. Il faut noter que 20 souches dont 17 souches de *B. abortus* et 3 souches de *B. melitensis*, isolées au cours de notre étude, n'ont pas pu être typées en biovar par manque de réactifs (antisérums monoclonaux).

Le secteur suivant représente la proportion de chaque biovar de *Brucella* identifié :

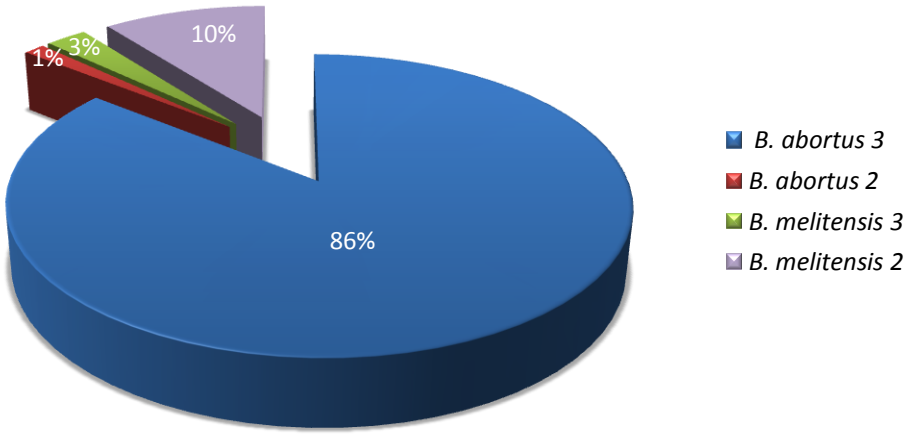


Figure 5.27: Proportion des biovars de *Brucella* isolés

Sur les 97 souches de *Brucella* isolées dans notre étude, 77 souches ont été typées en biovar :

- 66 souches de *B. abortus* bv 3 (86%) ;
- 08 *B. melitensis* bv 2 (10,4%) ;
- 02 *B. melitensis* bv 3 (2,6%) ;
- 01 *B. abortus* bv 2 (1,3%).

Ainsi ***B. abortus* bv 3** semble être le biovar dominant chez les bovins étudiés. C'est la première fois que ce biovar est isolé en Algérie. Au Maroc, *B. abortus* bv 3 a déjà été isolé chez les bovins, depuis les années 70 (Taoudi et *al.*, 1984)(Ducrotoy et al., 2015). *B. abortus* bv 3 est le biovar dominant dans plusieurs pays africains (Nigeria, Gambie, Kenya, Sénégal, Togo, Niger, Mali et Rwanda) (Akakpo and Ndour, 2013; Bankole et al., 2010; Bertu et al., 2015; Boukary et al., 2014; Muendo et al., 2012). Ce biovar est aussi retrouvé dans les pays euro-méditerranéens comme l'Italie (De Massis et al., 2014), la France(Garin-Bastuji and Delcueillerie, 2001), l'Espagne (Rodriguez-Torres et al., 1984) et la Turquie (Refai, 2002).
Il faut souligner que le laboratoire de référence des Brucelloses en France (ANSES) rapporte l'identification de *B. abortus* bv 3 chez un cas de brucellose humaine importée d'Algérie en 2003 (Garin- Bastuji, 2004 ; Cloeckaert et al., 2003). En Algérie, jusqu'à présent, aucune souche humaine de *B. abortus* bv 3 n'a été identifiée.

***B. melitensis* bv 2** vient en deuxième position, c'est également la première fois que ce biovar est identifié en Algérie et dans la région du Maghreb, mais on le retrouve dans le bassin méditerranéen, essentiellement en Espagne (Rodriguez-Torres et al., 1984), Italie (De Massis et al., 2014), Turquie et dans les pays du Moyen Orient (Benkirane, 2006; Refai, 2003).

***B. melitensis* bv 3** vient en troisième position ; pourtant jusqu'à notre étude, il était admis que c'était le biovar exclusif en Algérie, vu les données très réduites qu'on avait sur le plan bactériologique qui se résumaient à deux études qui ont isolé *B. melitensis* bv 3 (Boudilmi et al., 1990 ; Aggad et al., 2006), appuyées par les données du laboratoire sur les souches humaines provenant de différentes wilayas du pays, qui étaient toujours identifiées à *B. melitensis* bv 3 (Korichi et al., 2005).
B. melitensis bv 3 est le biovar prédominant dans le bassin méditerranéen et au Maghreb. La majorité des cas humains au Maghreb sont dus à ce biovar (Benzarti et al., 2009; Boudilmi et al., 1990; Chaabani, 1995; El Idrissi, 1996; Lounes et al., 2014). Dans les pays voisins, il a été identifié chez les petits ruminants, dans la région orientale du Maroc, provinces aux frontières algéro-marocaines (El Idrissi, 1996); et au centre ouest et sud ouest de la Tunisie, aux frontières algéro-tunisiennes(Chaabani, 1995, Benzarti et al., 2009).
Ce biovar a été isolé chez les bovins et les petits ruminants au sud de la France (Verger et al, 1989) et au sud de l'Italie (De Massis et al., 2014), en Espagne (Rodriguez-Torres et al., 1984), ainsi qu'en Turquie (Leyla et al., 2003).

Une seule souche de ***B. abortus* bv 2** a été isolée. C'est également la première fois que ce biovar est isolé en Algérie et dans la région du Maghreb. Ce biovar a été isolé en France entre les années 1982 et 1992, puis il n'a plus été retrouvé (Garin-Bastuji and Delcueillerie, 2001). Actuellement, il est isolé dans le continent Américain (USA, Amérique Centrale, Mexique, Brésil et argentine)(Acha and Szyfres, 2005; Godfroid et al., 2011; Moreno, 2002; Poester et al., 2002; Samartino, 2002), également retrouvé en Chine (Deqiu et al., 2002), en Iran (Benkirane, 2006; Refai, 2003) et en Turquie (Leyla et al., 2003). Ce biovar aurait pu être importé de la France, vu que l'Algérie importe des bovins depuis les années 70 d'Europe, essentiellement de France. Il faut savoir dans ces mêmes années, une étude menée sur des bovins importés a révélé que 10% des animaux étaient séropositifs (Benaissa et Benaouf, 1982).

8. Distribution épidémiologique des souches de *Brucella* identifiées

La distribution épidémiologique des souches de *Brucella* identifiées à travers les 4 régions étudiées, représente notre deuxième objectif, qui nous permet d'évaluer la propagation des *Brucella* chez les bovins à travers l'Algérie et la distribution de différentes espèces et biovars.

a) Distribution épidémiologique des espèces de *Brucella* identifiées par région

Les secteurs suivants représentent la distribution des espèces de *Brucella* identifiées à travers les 4 régions étudiées :

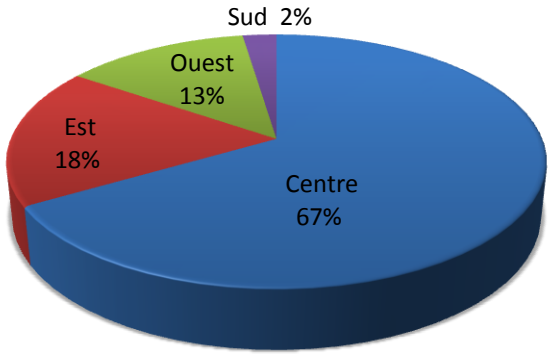


Figure 5.28: Répartition des souches de *B. abortus* par région

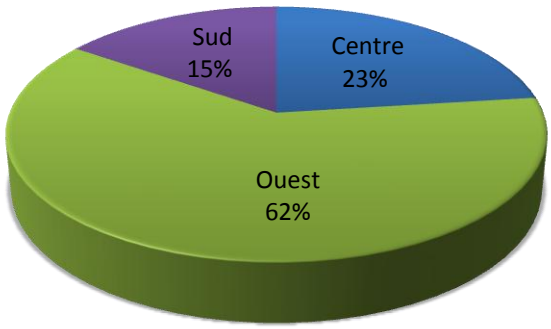


Figure 5.29: Répartition des souches de *B. melitensis* par région

B. abortus a été isolée dans toutes les régions d'Algérie. Nous constatons que plus de la moitié des souches ont été isolées dans la région Centre.

B. melitensis a été isolée au Centre, à l'Ouest et au Sud dont plus de la moitié isolée dans la région Ouest.

Nous n'avons pas isolé de *B. melitensis* à l'Est, mais cela ne suggère pas que cette espèce est inexistante dans cette région, car il n'y a aucun contrôle des mouvements des animaux entre wilayas, ni aux frontières tunisiennes où cette espèce de *Brucella* sévit (Benzarti et al., 2009; Benzarti et al., 2011), d'autant plus, que plusieurs cas humains à *B. melitensis* ont été rapportés dans cette région (IPA, communication personnelle).

Le tableau et la figure suivants représentent la proportion de chaque espèce isolée dans chacune des régions étudiées:

Tableau 5.39 : Les espèces de *Brucella* identifiés dans chaque région

Régions	*B. abortus*	Pourcentage (%)	*B. melitensis*	Pourcentage (%)
Centre	56	95%	3	5%
Est	15	100%	0	0%
Ouest	11	58%	8	42%
Sud	2	50%	2	50%

Le tableau 5.39 et la figure 5.30 montrent que l'espèce *B. abortus* est l'espèce quasiment exclusive chez le bovin dans les régions Est (100%) et Centre (95%), alors qu' au sud, *B. melitensis* représente 50 % et à l'Ouest 42% des souches isolées.

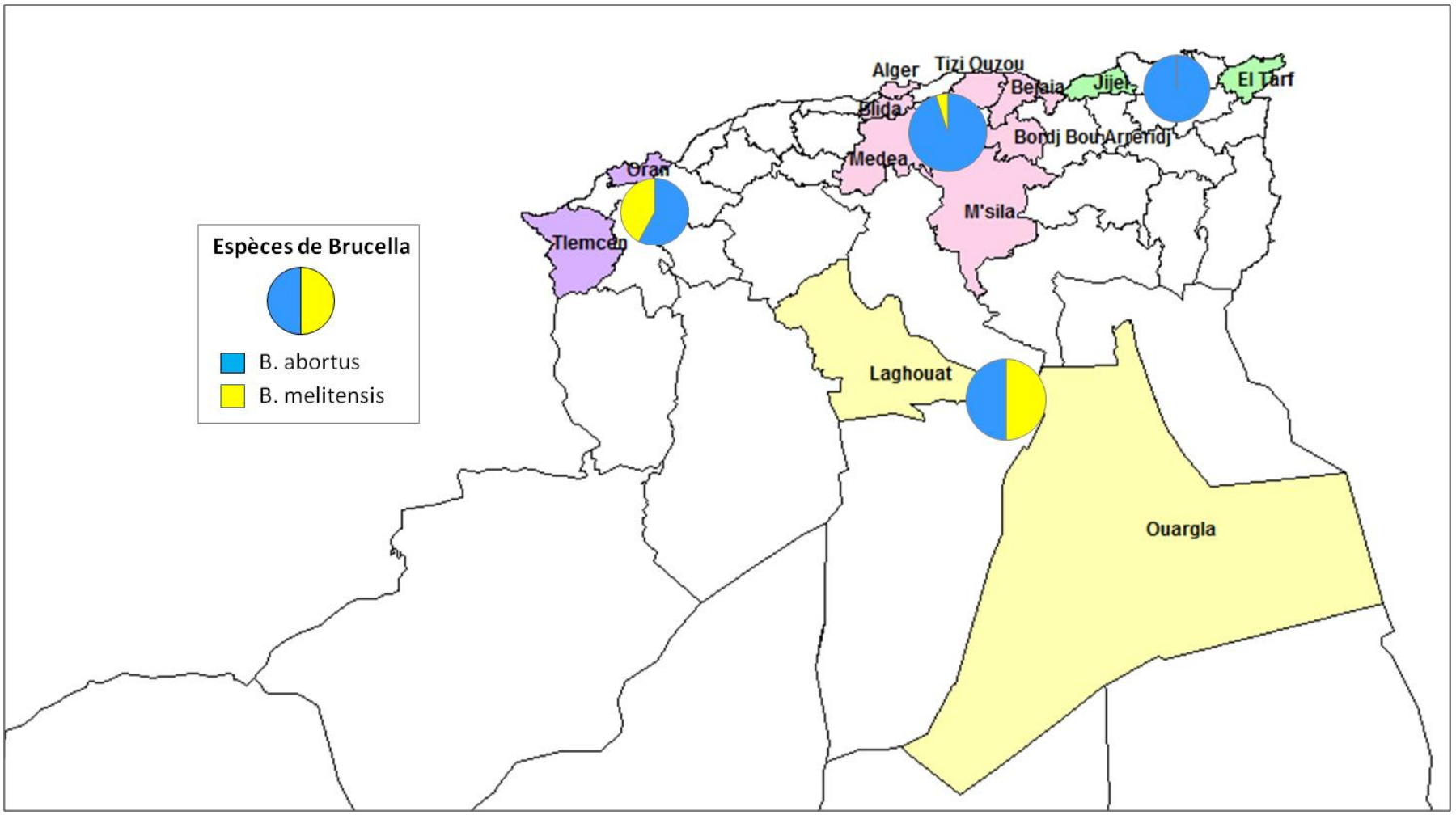


Figure 5.30 : Proportion de chaque espèce de *Brucella* isolée selon les régions étudiées.

B. melitensis est donc retrouvée en majorité dans la région Ouest. Il faut noter que les deux études bactériologiques antérieures ont été menées à l'Ouest du pays Boudilmi et al., 1990 chez les petits ruminants, dans 6 wilayas de l'Ouest et Aggad et al. 2006 chez les bovins à Tiaret, rapportent l'isolement uniquement de *B. melitensis*. D'autre part, une étude marocaine menée dans la région orientale (à la frontière de l'Algérie) a mis en évidence d'importants foyers de *B. melitensis* chez les petits ruminants (El Idrissi, 1996). Il faut savoir que les animaux peuvent traverser les frontières algéro-marocaines sans aucun contrôle et un grand marcher à bestiaux y demeure.

b) Distribution épidémiologique des biovars de *Brucella* identifiés par région

Nous avons établi la distribution épidémiologique des 77 souches typées en biovar selon les 4 régions étudiées :

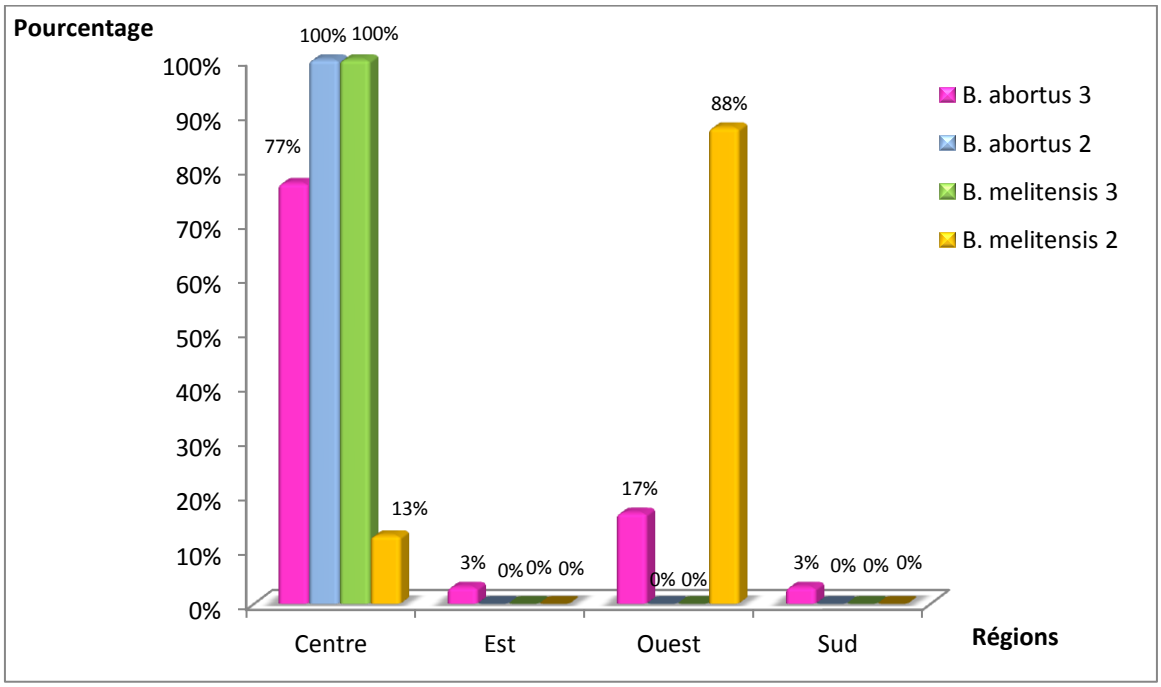


Figure 5.31: Proportion des Biovars *Brucella* identifiés selon les régions

Le biovar 3 de *B. abortus* a été isolé dans toutes les régions étudiées et en nombre important, il semble être **le biovar dominant** toutes les régions d'Algérie.

Le biovar 2 de *B. melitensis* vient en deuxième position et est retrouvé en majorité à l'Ouest du pays.

Ce biovars est habituellement retrouvé dans le bassin méditerranéen, essentiellement en Espagne (Rodriguez-Torres et al., 1984), Italie (De Massis et al., 2014), Turquie et dans les

pays du Moyen Orient (Benkirane, 2006; Refai, 2003). Il faut savoir que dans le passé, des chèvres maltaises furent importées de l'île de Malte (berceau de la brucellose) vers l'Algérie, la Tunisie et la Sicile en Italie (entre 1904 et 1909). Les chèvres espagnoles furent importées de Gibraltar vers l'Ouest de l'Algérie (Sergent, 1908; Sergent and Bories, 1908; Wyatt, 2009). On pourrait émettre l'hypothèse que l'origine de ce biovar à l'Ouest de l'Algérie provient de là.

Une seule souche de *B. abortus* bv 2 et 2 souches de *B. melitensis* bv 3 ont été isolées dans la région centre, cela confirme l'existence de ces biovars dans nos élevages bovins.

Le tableau suivant représente la proportion des biovars identifiés dans chaque région étudiée :

Tableau 5.40 : Les biovars identifiés pour chaque région

Régions	**Biovars**				**Total**
	B. abortus 3	***B. abortus 2***	***B. melitensis 3***	***B. melitensis 2***	
Centre	51 *(92,7%)*	1 *(1,8%)*	2 *(3,6%)*	1 *(1,8%)*	55
Est	2 *(100%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	2
Ouest	11 *(61,1%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	7 *(38,8%)*	18
Sud	2 *(100%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	2

Nous constatons qu'au niveau de la région Centre, les quatre biovars ont été isolés, avec une majorité de *B. abortus* bv 3 (93%)

Dans la région Ouest plus de la moitié des souches sont des *B. abortus* bv 3 (61%), alors que plus du tiers sont des *B. melitensis* bv 2 (39%).

c) Les espèces et biovars *Brucella* identifiés par wilaya

Le tableau 5.41 représente la distribution des espèces et biovars par wilaya :

B. abor = *B. abortus*

B. mel = *B. melitensis*

Tableau 5.41 : Les espèces et biovars *Brucella* identifiés par wilaya

Régions	Wilayas	*B. abr*	*B. abr 3*	*B. abr 2*	*B. mel*	*B. mel 3*	*B. mel 2*
Centre	Alger	0	5	0	0	0	0
	Blida	4	3	0	0	0	1
	Médéa	0	0	1	0	0	0
	M'sila	0	0	0	0	0	0
	Bordj Bou Arreridj	0	0	0	0	0	0
	Tizi Ouzou	0	11	0	0	0	0
	Béjaïa	0	32	0	0	2	0
Total centre		**4**	**51**	**1**	**0**	**2**	**1**
Est	Jijel	10	2	0	0	0	0
	El Taref	3	0	0	0	0	0
Total Est		**13**	**2**	**0**	**0**	**0**	**0**
Ouest	Tlemcen	0	11	0	1	0	4
	Oran	0	0	0	0	0	3
Total Ouest		**0**	**11**	**0**	**1**	**0**	**7**
Sud	Laghouat	0	2	0	2	0	0
	Ouargla	0	0	0	0	0	0
Total Sud		**0**	**2**	**0**	**2**	**0**	**0**
Total Algérie		**17**	**66**	**1**	**3**	**2**	**8**

B. melitensis bv 3 a été retrouvée dans la région Centre, au niveau de la wilaya de Béjaïa (commune de Timezrit), dans un seul élevage, isolée chez une seule vache Montbéliarde de 5 ans, au niveau de deux prélèvements différents (ganglions mammaires et lait).

B. melitensis bv 2 est retrouvée en majorité à l'Ouest du pays, mais nous avons isolé une souche au Centre, dans la wilaya de Blida (commune de Bouaarfa), chez une vache âgée de 6 ans, ne présentant aucun signe clinique.

Il faut souligner que dans notre étude, nous n'avons pas identifié au stade biovar, trois souches de *B. melitensis* (deux souches d'un même animal du Sud et une souche de l'Ouest). L'identification de ces trois souches aurait pu enrichir les données épidémiologiques de la distribution des biovars de *B. melitensis* en Algérie.

Une seule souche de *B. abortus* bv 2 a été isolée dans la région Centre, dans la wilaya de Médéa (commune de Bouchrahil), chez une vache de population locale, âgée de 6 ans présentant un avortement, dépistée dans le carde d'une enquête de PFE.

d) Carte épidémiologique de la distribution des *Brucella* chez les bovins en Algérie

Nous avons créé les cartes épidémiologiques suivantes qui représentent la distribution des espèces de *Brucella*, que nous avons identifiée :

La fig. 5.32 représente en demi-lunes la proportion des espèces de *Brucella* isolées dans chacune des wilayas étudiée. En bleu, *B. abortus* qu'on retrouve dans toutes les wilayas étudiées. En rouge, *B. melitensis* qu'on retrouve à Béjaïa et Blida, au Centre ; Oran et Tlemcen à l'Ouest et Laghouat au Sud.

La fig. 5.33 représente en cercles rouges la distribution du nombre de souches *B. abortus* dans les wilayas étudiées. Le plus grand nombre des souches de *B. abortus* sont isolées dans la wilaya de Béjaïa.

La fig. 5.34 représente en cercles orange la distribution du nombre de souches *B. melitensis* dans les wilayas étudiées. Le plus grand nombre des souches de *B. melitensis* sont isolées dans la wilaya de Tlemcen.

La fig. 5.35 représente en demi-lunes la proportion des biovars de *Brucella* isolés dans chacune des wilayas étudiée. En bleu, *B. abortus* bv 3, qu'on retrouve dans la majorité des wilayas étudiées. En jaune, *B. melitensis bv 2* qu'on retrouve au Centre, à Blida, à l'Ouest, à Oran et Tlemcen. *B. melitensis* bv 3 en rouge est retrouvé uniquement à Béjaïa. *B. abortus* bv 2 uniquement à Médéa.

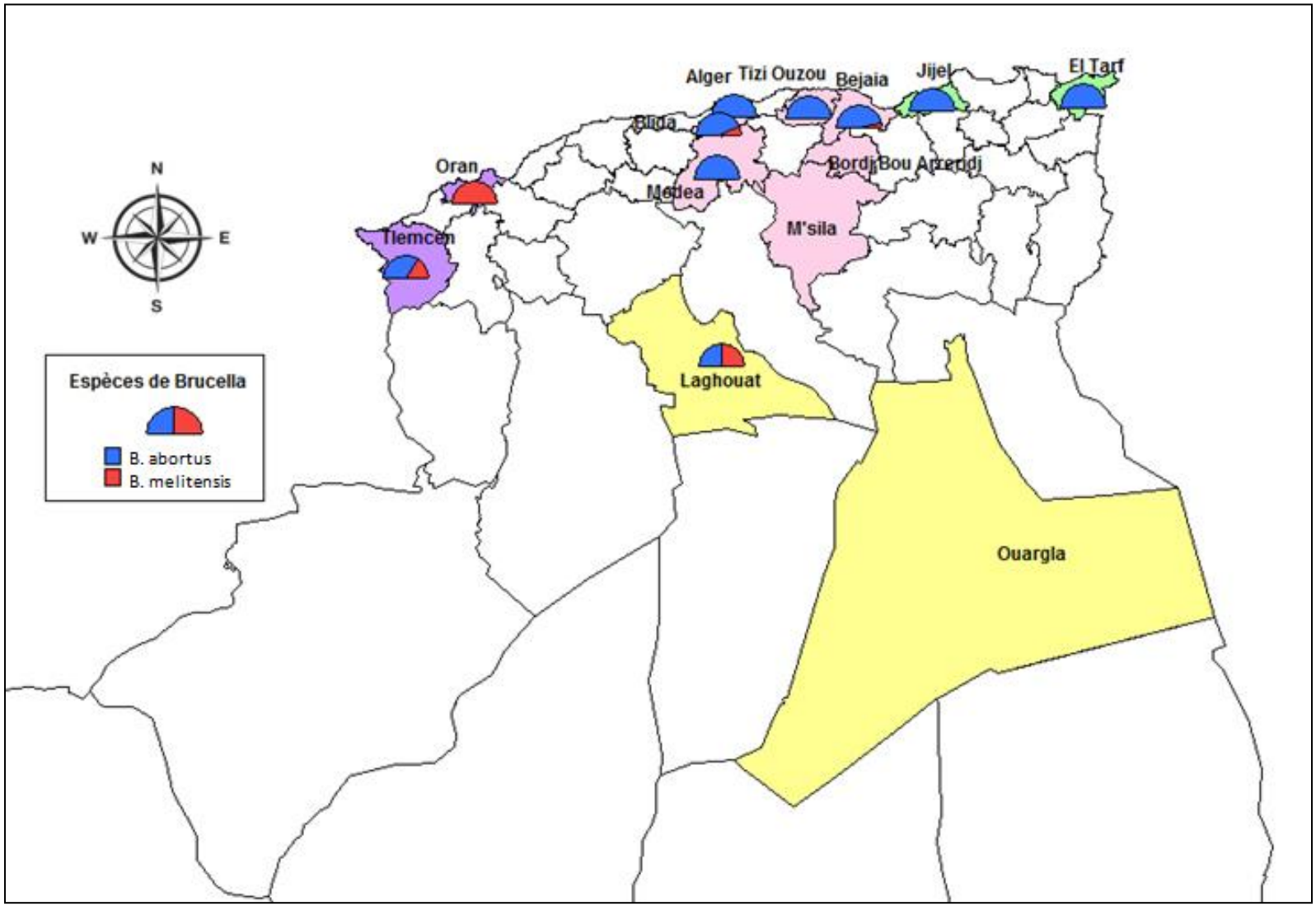


Figure 5.32: Proportion de chaque espèce de *Brucella* isolée dans chacune des wilayas étudiée

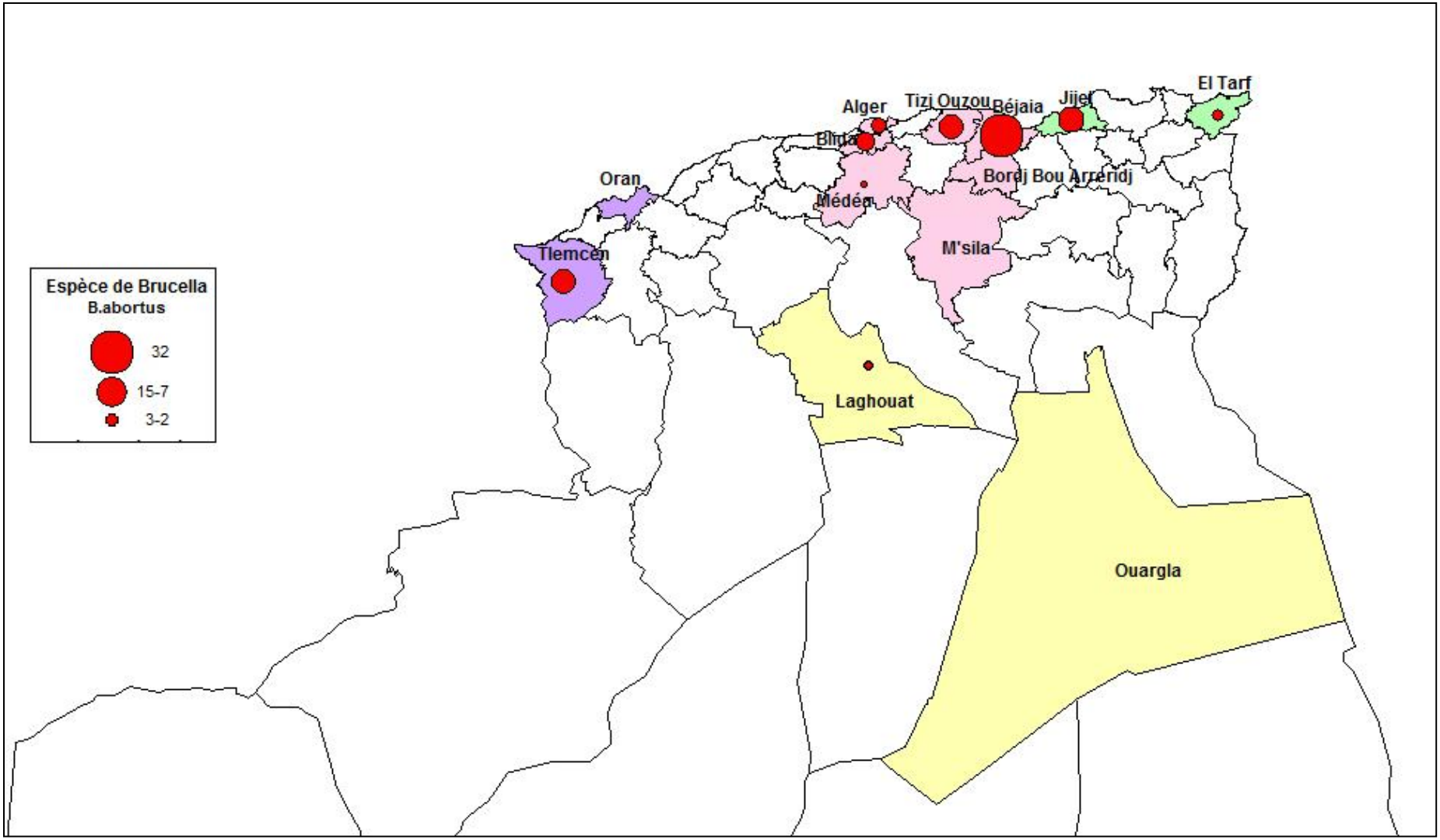


Figure 5.33: Distribution des souches *B. abortus* isolées dans les wilayas étudiées

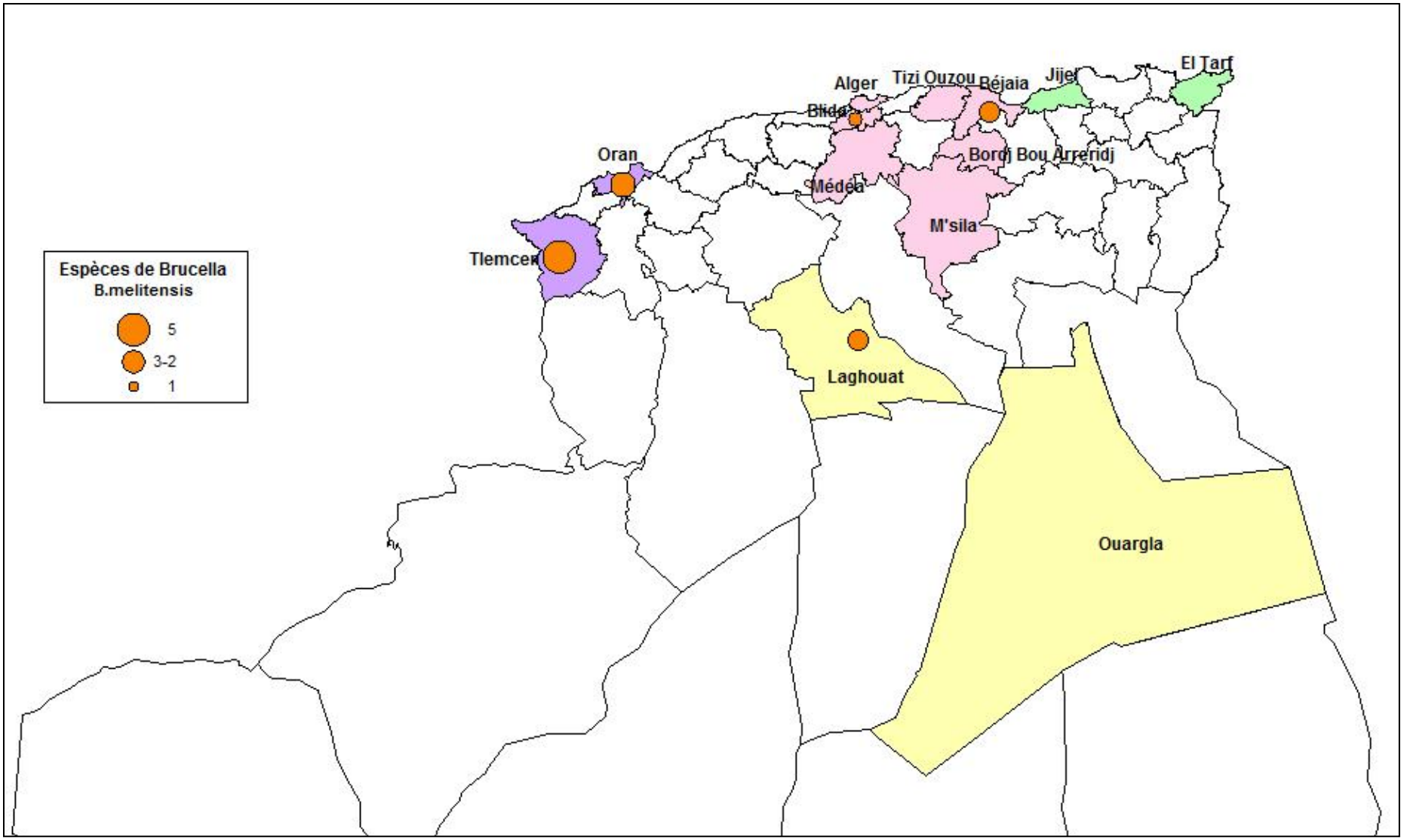


Figure 5.34: distribution des souches *B. melitensis* isolées dans les wilayas étudiées.

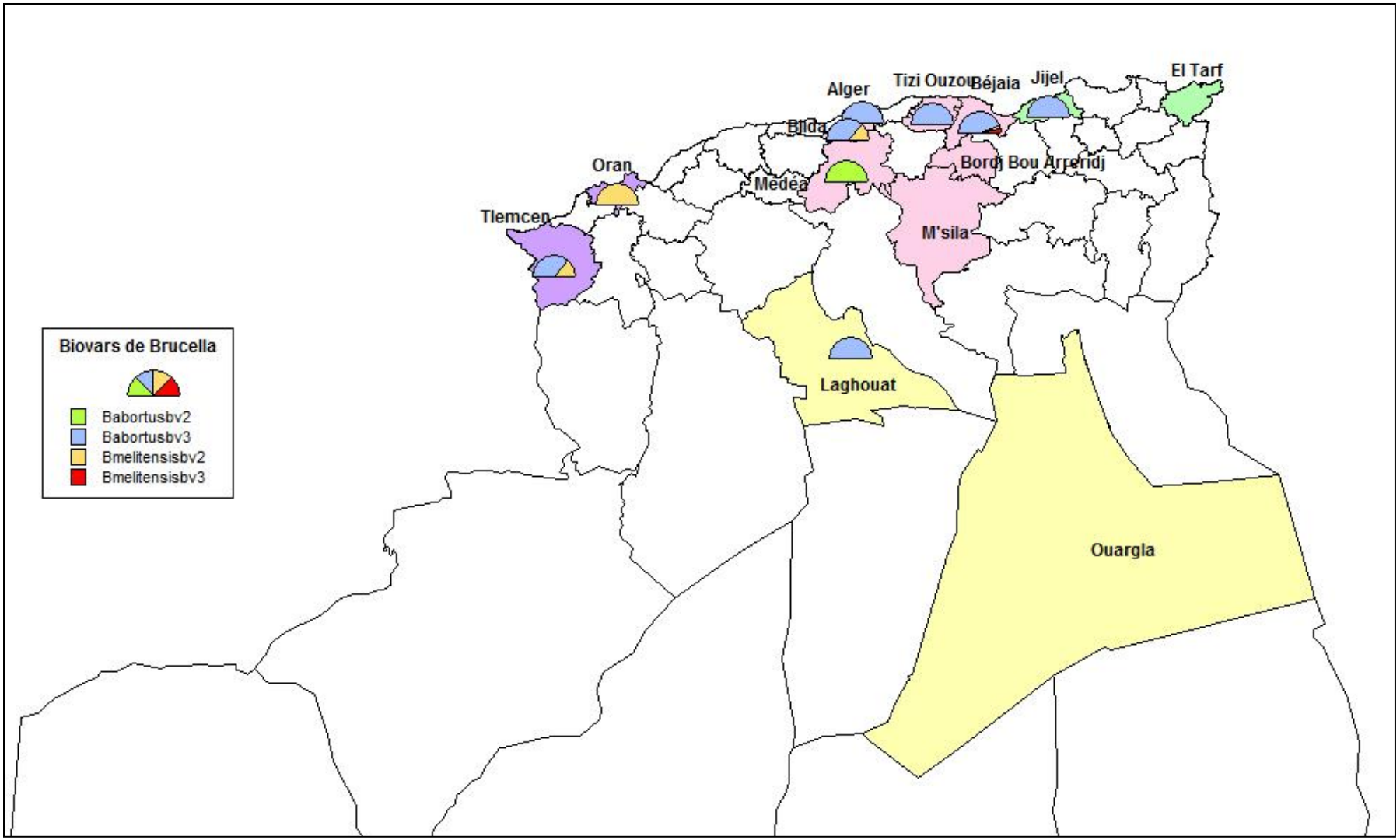


Figure 5.35 : distribution des différents biovars *Brucella* identifiés dans les wilayas étudiées

e) Les espèces et biovars de *Brucella* identifiés par type de prélèvements

Le tableau 5.42 représente le nombre de souches par espèces isolées selon le type de prélèvements :

Tableau 5.42 : Nombre d'espèces identifiées par type de prélèvements

Type de prélèvement	Espèces	
	B. abortus	***B. melitensis***
Lait	29 *(35,8%)*	6 *(46,1%)*
Ganglions rétropharyngiens	17 *(20,9%)*	1 *(7,7%)*
Ganglions rétromammaires	35 *(43,2%)*	6 *(46,1%)*
Total	81	13

X² = 1,38 ; p = 0,501*

**X^2* calculé sans prendre en considération les ganglions inguinaux.*

Statistiquement la différence est non significative, les espèces identifiées ne sont pas liées au type de prélèvements (*X² = 1,38 ; p = 0,501*). On peut noter toutefois que l'espèce *B. melitensis* est retrouvée à part égale dans le lait et les ganglions rétromammaires (46%), alors que l'espèce *B. abortus* semble un peu plus souvent isolée dans les ganglions rétromammaires (43 %) versus 36 % dans le lait.

Le tableau 5.43 représente le nombre de biovars isolés selon le type de prélèvements :

Tableau 5.43 : Nombre de biovars identifiés par type de prélèvements

Type de prélèvement	Biovars			
	B. abr 3	***B. abr 2***	***B. mel 3***	***B. mel 2***
Lait	21 *(31,8%)*	1 *(100%)*	1 *(50%)*	5 *(62,5%)*
Ganglions rétro-pharyngiens	17 *(25,7%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*
Ganglions rétro-mammaires	27 *(40,9%)*	0 *(0%)*	1 *(50%)*	3 *(37,5%)*
Ganglions inguinaux	1 *(1,5%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*

Tous les biovars identifiés ont été isolés dans le lait, mais 41% des *B. abortus* bv 3 ont été isolés dans les ganglions mammaires, puis un tiers dans le lait et un quart dans les ganglions rétro-pharyngiens. Plus de la moitié de *B. melitensis* bv 2 ont été isolés dans le lait et plus du tiers dans les ganglions retro-mammaires. Pour *B. melitensis* 3, les deux souches ont été isolées chez le même animal, au niveau du prélèvement de lait et des ganglions rétro-mammaires.

f) Les espèces et biovars *Brucella* identifiés par race

Nous nous sommes intéressés à étudier dans le tableau suivant, le nombre de souches isolées par espèces de *Brucella* pour chacune des races bovines étudiées :

Tableau 5.44: Nombre d'espèces *Brucella* identifiées par race

	Espèces		**Total**
Races	***B. abortus***	***B. melitensis***	
Locale	13 *(86,7%)*	2 *(13,3%)*	15
Montbéliarde	12 *(85,7%)*	2 *(14,3%)*	14
Holstein	25 *(100%)*	0 *(0,0%)*	25
Brune des Alpes	6 *(100%)*	0 *(0,0%)*	6
Frisonne	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	0
Croisée	23 *(82,1%)*	5 *(17,9%)*	28
Indéterminée	5 *(55,6%)*	4 *(44,4%)*	9

Nous ne pouvons pas faire de tests statistiques car les effectifs sont insuffisants, mais nous constatons que *Brucella abortus* est l'espèce quasi exclusive dans les différentes races bovines étudiées. *Brucella melitensis* a été isolée chez les animaux croisés, de population locale et de race Montbéliarde.

De même, nous avons étudié dans le tableau suivant, le nombre de souches isolées par biovars de *Brucella* pour chacune des races bovines étudiées :

Tableau 5.45: Nombre de biovars *Brucella* identifiés par race

	Biovars				**Total**
Races	**B. abr 3**	**B. abr 2**	**B. mel3**	**B. mel2**	
Locale	2 *(66,7%)*	1 *(33,3%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	3
Montbéliarde	11 *(84,6%)*	0 *(0,0%)*	2 *(15,4%)*	0 *(0,0%)*	13
Holstein	23 *(100%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	23
Brune des Alpes	4 *(100%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	4
Frisonne	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	0
Croisée	21 *(80,8%)*	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	5 *(19,2%)*	26
Indéterminée	5 (62,5%)	0 *(0,0%)*	0 *(0,0%)*	3 *(37,5%)*	8

Nous remarquons que *B. abortus* bv 3 est le biovar dominant quelque soit la race étudiée. La seule souche de *B. abortus* bv 2 a été isolée chez un bovin de la population locale. Les deux souches de *B. melitensis* bv 3 ont été isolées chez un seul bovin de race Montbéliarde. Les souches de *B. melitensis* bv 2 ont été isolées chez des bovins croisés.

g) Les espèces et biovars *Brucella* identifiés par tranche d'âge

Nous nous sommes intéressés à la répartition des espèces et biovars de *Brucella,* isolés au cours de notre étude, selon les différentes tranches d'âge que nous présentons dans les tableaux suivants:

Tableau 5.46 : Nombre d'espèces typées par tranche d'âge

Age	Espèce		Total
	B. abortus	***B. melitensis***	
[2-4ans]	42 *(93%)*	3 *(6,7%)*	45
[5-7ans]	32 *(84,2%)*	6 *(15,8%)*	38
[8-10ans]	5 *(100%)*	0 *(0%)*	5
>10 ans	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0
Indéterminé	5 *(55,5%)*	4 *(44,4%)*	9

Nous constatons que la souche prédominante est *B. abortus* dans toutes les tranches d'âge étudiées. *B. melitensis* n'est pas retrouvée chez les bovins âgés de plus de huit ans.

Tableau 5.47 : Nombre de biovars typés par tranche d'âge.

Age	Biovars				Total
	B. abortus 3	**B. abortus 2**	**B. melitensis 3**	**B. melitensis 2**	
[2-4ans]	39 *(95,1%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	2 *(4,9%)*	41
[5-7ans]	20 *(80,0%)*	1 *(4,0%)*	2 *(8,0%)*	2 *(8,0%)*	25
[8-10ans]	2 *(100%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	2
>10 ans	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0
Indéterminé	5 *(55,5%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	4 *(44,4%)*	9

Nous observons que *B. abortus* bv 3 est le biovar majoritaire quelque soit la tranche d'âge des bovins étudiés. Les autres biovars identifiés (*B. abortus* bv 2, *B. melitensis* bv 3 et *B. melitensis* bv 2) ont été isolés des animaux âgés entre 5 et 7ans.

h) Les espèces et biovars *Brucella* identifiés selon les signes cliniques

Nous avons également étudié le nombre de souches isolées selon les signes cliniques de brucellose que les animaux ont manifesté. Les tableaux suivants représentent le nombre d'espèces et biovars *Brucella* identifiés en fonction des signes cliniques présentés :

Tableau 5.48 : Nombre d'espèces typées selon les signes cliniques

Signes cliniques	*B. abortus*	*B. melitensis*	Total
Avortements	21 *(91,3%)*	2 *(8,7%)*	23
Rétentions placentaires	1 *(100%)*	0 *(0,0%)*	1
Rétention placentaire + Avortement	2 *(100%)*	0 *(0,0%)*	2
Arthrite + Avortement	1 *(100%)*	0 *(0,0%)*	1

Sur l'ensemble des souches isolées, 26 souches étaient associées à des signes cliniques manifestés par le bovin séropositif, dont 23 souches associées à des avortements seuls, une souche à une rétention placentaire, deux souches à une rétention placentaire associée à un avortement et une souche à une arthrite avec avortement.

La majorité des souches associées à un avortement (91%) sont des *B. abortus*, 9% sont des *B. melitensis.* Les souches associées aux rétentions placentaires et à l'arthrite sont également des *B. abortus.* Cela suggère que *B. abortus* semble être l'espèce la plus virulente chez les bovins étudiés.

Tableau 5.49 : Nombre de biovars typés selon les signes cliniques

Signes cliniques	*B. abortus 3*	*B. abortus 2*	*B. melitensis 3*	*B. melitensis 2*	Total
Avortements	12 *(80%)*	1 *(6,6 %)*	0 *(0,0%)*	2 *(13,3 %)*	15
Rétentions placentaires	1 *(100%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	1
Arthrite + Avortement	1 *(100%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	0 *(0%)*	1

Sur les 23 souches associées à des avortements, 15 ont pu être identifiées en biovars, dont 80% *B. abortus* bv 3, 13% *B. melitensis* bv *2* et 6% *B. abortus* bv 2.

Parmi les 21 souches de *B. abortus* associées à des avortements, 13 ont été identifiées en biovars, dont 12 sont des *B. abortus* bv 3 et une *B. abortus* bv 2.

Les deux souches de *B. melitensis* associées à des avortements ont été identifiées en *B. melitensis* bv 2.

Les souches *B. abortus* associées à la rétention placentaire et à l'arthrite sont identifiées en *B. abortus* bv 3.

Sur les 298 prélèvements effectués à partir de 161 bovins, nous avons pu isoler 97 souches de Brucella. Nous avons isolé au moins une souche chez 43% des bovins étudiés et deux souches ou plus chez 16% de bovins prélevés. Sachant que la moitié des souches (46%) ont été isolées chez des bovins âgés entre 2 et 4 ans.

Parmi les souches isolées, 87% appartiennent à B. abortus et 13% à B. melitensis. B. abortus bv 3 a été isolé en nombre important et dans toutes les régions étudiées, il semble être le biovar dominant chez les bovins en Algérie. Néanmoins, nous avons isolé B. melitensis bv 2, B. melitensis bv 3 et B. abortus bv 3. Nous constatons que B. melitensis bv 2 est essentiellement retrouvée dans la région Ouest.

L'âge et la race ne semblent pas influencer le biotype de Brucella isolé. La majorité des souches associées à des signes cliniques sont des B. abortus, confirmant une plus grande virulence chez les bovins.

B. Sensibilité aux antibiotiques

Les 86 souches de *Brucella* identifiées au cours de notre étude à l'institut Pasteur d'Algérie, ont été testées par la méthode E-test à 6 antibiotiques utilisés dans le traitement de la brucellose humaine. Le tableau 5.50 représente les résultats obtenus :

Tableau 5.50 : Sensibilité des souches de *Brucella* identifiées aux 6 antibiotiques testés

Antibiotiques	Souches											
	B. abr **(n=17)**		***B. abr* 3** **(n=55)**		***B. abr* 2** **(n=1)**		***B. mel*** **(n=3)**		***B.mel3*** **(n=2)**		***B.mel2*** **(n=8)**	
	S	**R**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**R**	**S**	**R**
Streptomycine	17 *(100%)*	0 *(0%)*	**51** ***(92,7%)***	**4** ***(7,3%)***	1 *(100%)*	0 *(0%)*	3 *(100%)*	0 *(0%)*	2 *(100%)*	0 *(0%)*	8 *(100%)*	0 *(0%)*
Rifampicine	17 *(100%)*	0 *(0%)*	55 *(100%)*	0 *(0%)*	1 *(100%)*	0 *(0%)*	3 *(100%)*	0 *(0%)*	2 *(100%)*	0 *(0%)*	8 *(100%)*	0 *(0%)*
Gentamicine	17 *(100%)*	0 *(0%)*	55 *(100%)*	0 *(0%)*	1 *(100%)*	0 *(0%)*	3 *(100%)*	0 *(0%)*	2 *(100%)*	0 *(0%)*	8 *(100%)*	0 *(0%)*
Doxycycline	17 *(100%)*	0 *(0%)*	55 *(100%)*	0 *(0%)*	1 *(100%)*	0 *(0%)*	3 *(100%)*	0 *(0%)*	2 *(100%)*	0 *(0%)*	8 *(100%)*	0 *(0%)*
Tétracycline	17 *(100%)*	0 *(0%)*	55 *(100%)*	0 *(0%)*	1 *(100%)*	0 *(0%)*	3 *(100%)*	0 *(0%)*	2 *(100%)*	0 *(0%)*	8 *(100%)*	0 *(0%)*
Trimethoprime-sulfaméthoxazole	17 *(100%)*	0 *(0%)*	55 *(100%)*	0 *(0%)*	1 *(100%)*	0 *(0%)*	3 *(100%)*	0 *(0%)*	2 *(100%)*	0 *(0%)*	8 *(100%)*	0 *(0%)*

***S :** Sensible **R :** Résistant*

Sur les 86 souches identifiées, nous avons détecté 4 souches de *B. abortus* bv 3 résistantes à la streptomycine.

Ces quatre souches résistantes ont été isolées des ganglions rétro-pharyngiens (2 souches) et rétro-mammaires (2 souches), chez deux femelles de race Brune des Alpes, âgés de 3 et 4 ans, appartenant au même élevage dans la wilaya de Tizi Ouzou, commune de Makouda, village de Tarbent. Ces deux vaches n'ont présenté aucun signe clinique.

Nous n'avons pas plus d'informations sur ces animaux, ni sur cet élevage, car ce sont des bovins prélevés au niveau de l'abattoir de Rouïba, venus pour un abattage sanitaire et accompagnés d'un ordre d'abattage qui contient très peu d'informations.

Le traitement des bovins atteints de la brucellose est interdit, mais la streptomycine est un antibiotique utilisé sur le terrain, dans les traitements de routine, pour différentes pathologies chez les bovins. Il est donc possible que ces deux vaches aient été traitées avec la streptomycine pour une autre pathologie et les Brucella ont développé une résistance. Mais le danger réside dans le fait que cet antibiotique soit préconisé pour le traitement de la brucellose humaine.

La littérature rapporte que la résistance acquise à ces antibiotiques est rare en clinique. Mais qu'il est aisé de sélectionner in vitro des mutants résistants à la rifampicine (Maurin, 2007). D'ailleurs, il a déjà été signalé en Algérie, une antibiorésistance de souches humaines de *B. melitensis* 3 à la rifampicine (Benslimani et al., 2012). En Tunisie, des souches humaines de *B. abortus* se sont révélées résistantes au Trimethoprime- sulfaméthoxazole (Zribi et al., 2009).

C. Détection du genre *Brucella* par PCR en temps réel (PCR-TR)

Quatre-vingt-quatre ganglions lymphatiques prélevés sur 48 bovins séropositifs (voir annexe 7) ont été analysés en PCR-TR afin de détecter la présence du genre *Brucella*.

a) Résultats des PCR-TR

i. Au niveau des prélèvements

Les résultats de l'analyse des 84 ganglions lymphatiques par la PCR-TR sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5.51 : Analyse des prélèvements par PCR-TR

	Nombre de prélèvements				**Total**
	Positifs	***Négatifs***	***Douteux***	***Inhibition***	
PCR-TR	32 *(38,1 %)*	37 *(44 %)*	14 *(16,7 %)*	1 *(1,2 %)*	84 *(100 %)*

Sur les 84 ganglions lymphatiques analysés dans notre étude, 32 étaient positifs en PCR-TR, ce qui représente un taux de 38,1 % et 37 étaient négatifs (44 %). De plus, 14 prélèvements (16,7 %) présentent des résultats PCR pour lesquels l'interprétation demeure douteuse en PCR-TR.

Notons également qu'une amplification PCR n'a pas pu être analysée à cause d'une inhibition. En effet, plusieurs substances peuvent inhiber l'amplification (Romero *et al*., 1995), dont la présence de grandes quantités d'ADN génomique bovin qui pourrait entraver l'accessibilité aux cibles, et donc avoir des effets inhibiteurs sur l'analyse par PCR (O'Leary *et al*., 2006).

ii. Au niveau des animaux

Nous considérons un animal positif en PCR-TR lorsqu'au minimum un prélèvement analysé est positif. Les résultats des PCR-TR en fonction des animaux sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5.52 : Résultats des PCR-TR au niveau des animaux

	Nombre d'animaux positifs	**Nombre d'animaux négatifs**	**Total**
PCR- TR	22 *(46 %)*	26 *(54 %)*	48

Sur les 48 animaux séropositifs, 46 % (n = 22) étaient positifs en PCR-TR, et 54 % (n = 26) étaient négatifs.
Considérant les animaux, 46 % étaient positifs en PCR-TR, contre 48 % en bactériologie (Tableau 5.52). La différence entre les deux méthodes n'est pas statistiquement significative.

b) Comparaison des approches moléculaires (PCR-TR) et bactériologiques pour la détection du genre *Brucella* dans les prélèvements bovins

Les résultats obtenus par PCR-TR sont comparés à ceux retrouvés en bactériologie sur les mêmes prélèvements :

Tableau 5.53 : Résultats en PCR-TR *vs* Bactériologie à partir des prélèvements

	Nombre de prélèvements				**Total**
	Positifs	***Négatifs***	***Douteux***	***Inhibition***	
PCR-TR	32 *(38,1 %)*	37 *(44 %)*	14 *(16,7 %)*	1 *(1,2 %)*	84 *(100 %)*
Bactériologie	29 *(34,5 %)*	55 *(65,5 %)*	n/a	n/a	84 *(100 %)*

n/a : non applicable

Concernant l'analyse des ganglions lymphatiques, 38,1 % étaient positifs en PCR-TR, *vs* 34,5 % pour la bactériologie. Néanmoins, cette différence est plus importante concernant les résultats négatifs : 44 % pour la PCR-TR *vs* 65.5 % pour la bactériologie.

La PCR-TR semble donc plus sensible que la bactériologie, comme précédemment rapporté à partir de ganglions lymphatiques (Ilhan *et al.*, 2008), ainsi que sur des prélèvements de lait (Hamdy et Amin, 2002 ; Leal-Klevezas et *al.*, 1995). En complément d'un seuil de détection moins élevé, ceci pourrait être attribué entre autre au fait que les approches moléculaires détectent les ADN de *Brucella*, extraits des microorganismes morts et vivants, alors que la bactériologie détecte uniquement les microorganismes vivants.

Il est intéressant de noter que des isolements bactériologiques ont été obtenus à partir de 3 des prélèvements douteux en PCR.

Tableau 5.54 : Nombre d'animaux positifs en PCR-TR *vs* Bactériologie

	Nombre d'animaux positifs	**Nombre d'animaux négatifs**	**Total**
PCR- TR	22 *(46 %)*	26 *(54 %)*	48
Bactériologie	23 *(48 %)*	25 *(52 %)*	48

De façon intéressante, les analyses microbiologiques nous ont permis d'isoler une souche à partir d'un animal chez lequel la PCR-TR n'avait pas détecté la présence de la bactérie.

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par O'Leary *et al*., 2006. Dans cette précédente étude, la sensibilité de la bactériologie pour la détection de *B. abortus* est supérieure à celle de la PCR.

Nous nous focalisons sur une comparaison détaillée des résultats obtenus en PCR-TR et en bactériologie.

Tableau 5.55 : Comparaison des résultats PCR –TR *vs* Bactériologie

	PCR -TR "Positive"	**PCR-TR "Négative"**	**PCR-TR "Douteux"**	**PCR-TR Inhibition**	**Total**
Bactériologie positive	17 *(20,2 %)*	9 (*10,7 %)*	3 *(3,6 %)*	0	29 *(34,5 %)*
Bactériologie négative	15 (*17,9 %*)	28 *(33,3 %)*	11 *(13,1 %)*	1 *(1,2 %)*	55 *(65,5 %)*
Total	32 *(38,1 %)*	37 *(44 %)*	14 *(16,7 %)*	1 *(1,2 %)*	84 *(100 %)*

En résumé, nos résultats (Tableau 5.55) indiquent que 17 (20.2 %) prélèvements sont positifs en PCR-TR et en bactériologie (vrais positifs), et 28 (33.3 %) prélèvements sont négatifs en PCR-TR et en bactériologie (vrais négatifs).

De plus, 15 (17.9 %) prélèvements sont positifs en PCR-TR, mais négatifs en bactériologie (faux positifs). Inversement, 9 (10.7 %) prélèvements sont négatifs en PCR-TR, mais positifs en bactériologie (faux négatifs), ceci pourrait être dû à des inhibiteurs de la PCR.

c) Distribution des *Brucella* dans les prélèvements bovins

Nous avons analysé 84 ganglions lymphatiques, dont 44 ganglions rétro-pharyngiens et 40 ganglions rétro-mammaires par les approches classiques microbiologiques et par les approches moléculaires. Le tableau 5.56 représente les résultats retrouvés dans les deux types de prélèvements.

Tableau 5.56 : Résultats bactériologiques et moléculaires selon les types de prélèvements

	BACTERIOLOGIE		**PCR-TR**				
Type Ganglions	***Positive***	***Négative***	***Positive***	***Négative***	***Inhibition***	***Douteux***	**Total**
Ganglions Pharyngiens	12 *(27,3 %)*	32 *(72,7 %)*	13 *(29,5 %)*	23 *(52,3 %)*	7 *(16 %)*	1 *(2,3 %)*	44
Ganglions Mammaires	17 *(42,5 %)*	23 *(57,5 %)*	19 *(47,5 %)*	14 *(35 %)*	7 *(17,5 %)*	0 *(0 %)*	40

Les sensibilités des deux approches : bactériologie *vs* PCR-TR restent similaires pour ces deux types de prélèvement.

Comme décrit précédemment, les ganglions rétro-mammaires sont les plus fréquemment infectés par *Brucella*. Dans notre étude, 42.5 à 47.5 % des ganglions rétro-mammaires mettent en évidence la présence de *Brucella* par méthode directe (bactériologie et/ou PCR). Néanmoins, les *Brucella* sont également localisées dans 27.3 à 29.5 % des cas dans les ganglions rétro-pharyngiens. Ces données sont cohérentes avec celles de la littérature (Ilhan et *al.*, 2008 ; O'Leary *et al*., 2006 ; Gupta *et al*., 2006). En effet, Philippon et coll. rapportaient que *B. abortus* était localisée dans 89 % des cas dans les mamelles et de 74-75 % dans les ganglions de la tête (Philippon *et al.*, 1970).

Ces deux prélèvements constituent les prélèvements de choix pour la détection des *Brucella* par la bactériologie et/ou les techniques moléculaires.

IV. DISCUSSION GENERALE DE LA PARTIE I

Nous avons menée notre étude d'octobre 2011 à mai 2014, période de deux ans et sept mois, durant laquelle nous avons pu recruter 161 bovins séropositifs, provenant de 97 foyers, détectés lors du dépistage de la brucellose. Ces bovins sont issus de 56 communes, réparties sur 13 wilayas, des quatre régions d'Algérie (Centre, Est, Ouest et Sud). Notre échantillon est composé de 160 femelles et 1 mâle, âgés de 2 à 13 ans, de différentes races (locale, Montbéliarde, Holstein, Brune des Alpes, Frisonne et croisée).

Les bovins étudiés ont fait l'objet de 298 prélèvements, grâce au réseau national vétérinaire que nous avons mis en place avec la collaboration des services vétérinaires. Nous avons ciblé trois types de prélèvements : le lait, les ganglions rétro-pharyngiens et les ganglions rétro-mammaires. Ainsi nous avons collecté 109 prélèvements de lait et 189 prélèvements de ganglions, dont 97 ganglions rétro-pharyngiens, 89 ganglions rétro-mammaires.

Nombre d'animaux positifs

Dans notre étude, nous n'avons prélevé que des bovins séropositifs à un ou deux tests sérologiques (EAT seul ou EAT + FC). A l'issu de la recherche bactériologique, nous avons pu isoler des *Brucella* à partir de 43% [35,4 – 50,6%] des bovins étudiés dans toutes les régions ; ce qui représente 41% [31,4 - 51%] des foyers. Ainsi la moitié des animaux séropositifs sont également positifs en bactériologie. Cependant, nous n'avons pas pu isoler des *Brucella* sur l'autre moitié, cela peut s'expliquer par différents paramètres :

- le lieu d'entrée et de multiplication de la bactérie qui peut être différent des lieux de prélèvements ciblés ;
- le manque de la totalité des prélèvements chez 73% des animaux étudiés ;
- le stade de la maladie peut influencer le nombre et la localisation ainsi que la période d'excrétion des *Brucella* ;
- la sensibilité des bactéries aux conditions de réalisation du prélèvement (parfois très contaminés), aux conditions de transport (wilayas loin de 700 à 800 Km) et à la durée de conservation des prélèvements (à -20°C durant de 1 à 6 mois).

D'autres études bactériologiques dans différentes régions du monde, sur différentes espèces animales et différents types de prélèvements rapportent les mêmes constations (Amin et al., 2001; Hamdy and Amin, 2002; Ilhan et al., 2008; Manterola et al., 2003).

Nos résultats rapportent que le taux d'animaux positifs en bactériologie le plus élevé est observé au niveau de la région Ouest avec 67%, alors qu'il est respectivement de 44, 31 et 30% dans la région Centre, Est et Sud. Paradoxalement, c'est la région Centre qui a le plus grand nombre d'animaux étudiés et de prélèvements par animal (3 et plus).

Dans notre étude, la région Ouest est représentée en majorité par la wilaya de Tlemcen. En effet, cette wilaya est une région à forte prévalence de la brucellose bovine, puisque un nombre important de foyers sont déclarés chaque année dans cette wilaya (DSV, 2007 ; 2010).

Dans notre étude l'âge et la race des animaux étudiés ne semble pas avoir d'influence sur le taux de positivité en bactériologie. Par contre, sur le plan clinique, 27% des animaux étudiés ont présenté des signes cliniques tels que des avortements, des rétentions placentaires ou des arthrites, dont la moitié était positifs en bactériologie. Ce qui confirme dans ces cas que l'origine du symptôme était la brucellose. Cependant, plus de la moitié des bovins étudiés séropositifs n'ont pas présenté de signes cliniques, pourtant 40% d'entre eux étaient positifs en bactériologie, ce qui représente un diagnostic de certitude, suggérant ainsi une forme inapparente de la brucellose.
En effet, la littérature rapporte une fréquence importante des formes inapparentes, 20 à 60% des vaches sérologiquement positives, sans symptômes de brucellose, éliminent le germe dans le colostrum et le lait (Ganière, 2004).
Les avortements ont présenté la proportion la plus importante des signes cliniques, parfois associés à une rétention placentaire ou à une arthrite. Ce qui rejoint la littérature qui rapporte que les animaux les plus sensibles sont les femelles gestantes et que l'avortement constitue le symptôme cardinale de la brucellose bovine et est souvent accompagné de rétention placentaire (Ganière, 2004, Godfroid et al., 2003).
Plus d'un quart des vaches étudiées ont présenté un avortement, parmi celle-ci, 44% étaient positives en bactériologie, ce qui confirme que *Brucella* était à l'origine de ces avortements.

Nombre de prélèvements positifs

A l'issue de la recherche bactériologique, nous avons isolé des *Brucella* à partir de 97 prélèvements sur les 298 réalisés, ce qui représente un taux de positivité de **32,5%** [27,2 – 37,9%]. Ce taux d'isolement est largement supérieur a ceux retrouvés dans deux autres études : en Algérie par Aggad et al. 2006 (1/39 prélèvements de lait) ; au Nigeria par Ocholi et al. 2004 (25/830 prélèvements) ; mais inferieur à celui retrouvé en Egypte par Hamdy et al. 2002 (24/52 prélèvements de lait), qui ont utilisé la même méthode d'isolement bactériologique (Alton et al., 1988). Notons que 201 prélèvements étaient négatifs en bactériologie, cela peut s'expliquer par le stade de l'infection des vaches qui dans cette étude n'est pas connue. Les vaches ont été diagnostiqués comme positive en utilisant des méthodes sérologiques de routine et donc avait évidemment une réponse immunitaire. Par conséquent, il est peu probable que les animaux étaient dans les premiers stades de l'infection lors du prélèvement. La possibilité demeure que certains des animaux peuvent avoir expulsé les bactéries avant l'échantillonnage. Il est possible aussi que les bactéries étaient présentes à de très faibles quantités.
Il est admis dans la littérature que l'excrétion des *Brucella* dans le lait est intermittente. Ainsi, le stade de l'infection au cours de laquelle un échantillon est prélevé pourrait avoir un impact majeur sur la détection bactérienne.

Il ressort de nos résultats que le taux de positivité varie en fonction du type de prélèvements. En effet, nous avons isolé le plus grand nombre de *Brucella* dans les ganglions rétro-mammaires (46% [35,7 – 56,4%]), puis dans le lait (32%, [23,3 – 40,9%]) et enfin dans les ganglions rétropharyngiens (18,5 % [10,8 – 26,3%]). Ce qui suggère que nous avons plus de chance d'isoler des *Brucella* dans les ganglions rétro-mammaires et dans le lait que dans les ganglions rétropharyngiens. Ceci confirme l'étude menée par Marin et al. 1996 chez les petits ruminants. Ainsi que les résultats obtenus par O'Leary et al 2006 qui suggèrent que la bactérie peut être facilement détectable dans les tissus lymphatiques.

Il semble donc, que les ganglions mammaires et le lait semblent être les prélèvements de choix pour l'isolement des *Brucella*.

En contre partie, le fait qu'un tiers des prélèvements de lait et presque la moitié des ganglions mammaires contiennent des *Brucella,* est inquiétant pour la santé publique, vu les habitudes alimentaires de la population qui apprécie la consommation de lait cru de vache et des fromages artisanaux. Le même constat a été fait dans une étude au Nigeria où 48% du lait contenait des *Brucella* (Ocholi et al., 2004).

Caractérisation phénotypique

A l'issue de notre étude, nous avons pu isoler 97 souches de *Brucella* sur 69 animaux positifs en bactériologie au niveau des quatre régions étudiées.

Selon la porte d'entrée et la localisation de la bactérie dans l'organisme de l'animal, les souches ont pu être isolées d'un ou de plusieurs prélèvements. Nous avons donc isolé une, deux ou trois souches par animal. Une souche chez 27%, deux souches chez 15% et trois souches chez 1% des bovins étudiés. Ce qui implique que nous avons isolé au moins une souche chez 43% des bovins étudiés et deux souches ou plus chez 16% de bovins prélevés.

Nous nous sommes intéressés à la relation qui pourrait exister entre le nombre de souches isolées et certaines caractéristiques de l'animal. Nous observons que le plus grand nombre de souches (29%) a été isolé chez les bovins croisés et presque la moitié des souches (46%) ont été isolées chez des bovins âgés entre 2 et 4 ans, tranche d'âge qui correspond à la pleine reproduction, donc les plus sensibles à la brucellose (essentiellement les femelles gestantes). On estime par exemple qu'une vache adulte contaminée hors gestation a la possibilité dans prés de 50% des cas de ne développer qu'une infection de courte durée spontanément curable (Ganière, 2004). Nous remarquons que plus on avance dans l'âge, moins de souches sont isolées. Cela peut s'expliquer par le fait que la brucellose serait sous forme chronique à un âge avancé, ce qui diminue les chances d'isoler une souche à ce stade de la maladie.

Sur les 161 animaux étudiés, 43 bovins ont présenté des signes cliniques de brucellose, sur lesquels nous avons isolé 27 souches de *Brucella*. Parmi lesquelles, 23 souches ont été isolées sur 18 vaches présentant des avortements, une souche sur une vache présentant une rétention placentaire seule, deux souches sur une vache présentant simultanément un avortement et une

rétention placentaire et une souche sur un bovin présentant une arthrite associée à un avortement.
A l'opposé, 83 bovins étudiés ne présentaient aucun signe clinique, nous avons isolé 46 souches sur 33 d'entre eux. En effet, une quantité importante de *Brucella* est excrétée par la femelle infectée par les voies génitales et mammaires (lait et colostrum), y compris dans les formes asymptomatiques (GDS, 2003).

Nous constatons que la moitié des souches *Brucella* (47%) sont isolées chez les animaux qui ne présentent aucun signe clinique ou asymptomatiques, et un quart (24%) chez les animaux qui présentent un avortement. Il est aussi intéressant de souligner que toutes les souches des femelles qui ont présenté un avortement ont été isolées soit du lait et/ ou des ganglions mammaires, ce qui implique une infection simultanée de l'utérus et de la mamelle. En effet, il est rapporté que 70-80% des vaches éliminent le germe dans le colostrum et le lait après un avortement (Ganière, 2004).

Espèces de *Brucella* isolées

Les 97 souches de *Brucella* isolées dans notre étude, ont été typées en deux espèces de *Brucella* : 87% [79,8 – 93,4%] de *B. abortus* et 13% [6,6 – 20,2%] de *B. melitensis. B. abortus* semble être l'espèce dominante chez les bovins étudiés. En effet, cette espèce est le principal agent de la brucellose bovine. Pourtant, c'est la première fois qu'elle est isolée en Algérie. *B. abortus* a été isolée dans les quatre régions d'Algérie ; et plus de la moitié retrouvée dans la région Centre.
Les bovins peuvent aussi être infectés par *B. melitensis,* comme nos résultats l'indiquent. Une souche brucellique hétérologue peut provoquer une maladie plus éphémère que celle causée par *B. abortus* (Acha and Szyfres, 2005), ce qui explique le taux de *B. melitensis* retrouvé chez les bovins de notre étude. Cependant, ces infections croisées représentent une sérieuse menace pour la santé publique, parce que ces *Brucella*, qui sont hautement pathogènes pour l'homme, peuvent passer dans le lait de vaches comme c'est le cas dans notre étude où 12/13 souches de *B. melitensis* ont été isolées de la mamelle (lait et/ou ganglions mammaires).

B. melitensis a été isolée au Centre, à l'Ouest et au Sud dont plus de la moitié isolée dans la région Ouest. D'une part, les deux études bactériologiques antérieures ont été menées à l'Ouest du pays Boudilmi et al., 1990 chez les petits ruminants, dans 6 wilayas de l'Ouest et Aggad et al. 2006 chez les bovins à Tiaret rapportent l'isolement uniquement de *B. melitensis*. D'autre part, une étude marocaine menée dans la région orientale (à la frontière de l'Algérie) a mis en évidence d'importants foyers de *B. melitensis* chez les petits ruminants (El Idrissi, 1996). Il faut savoir que les animaux peuvent traverser les frontières algériennes sans aucun contrôle et un grand marcher à bestiaux y demeure.

Au niveau régional, l'espèce *B. abortus* est l'espèce quasiment exclusive chez le bovin dans les régions Est (100 %) et Centre (95%), alors qu'au sud, *B. melitensis* représente 50% et à l'Ouest 42% des souches isolées. La littérature rapporte que les bovins peuvent être infectés par *B. melitensis* quand ils partagent les mêmes pâturages et les mêmes installations que des

caprins ou ovins infectés (Godfroid et al., 2003). Nous n'avons pas cette information concernant les bovins étudiés.

Les Biovars de *Brucella* isolés

Nous avons pu typer 77 souches en biovar sur les 97 isolées, les 20 souches restantes, n'ont pas pu être typées en biovar par manque de réactifs (antisérums monoclonaux).

Les biovars retrouvés par ordre décroissant sont :

- 86% de *B. abortus* bv 3,
- 10% de *B. melitensis* bv 2,
- 3% de *B. melitensis* bv 3,
- 1% de *B. abortus* bv 2.

Il ressort de nos résultats que ***B. abortus* bv 3** est le biovar dominant chez les bovins étudiés. C'est la première fois que ce biovar est isolé en Algérie. Au Maroc, *B. abortus* bv 3 a déjà été isolé chez les bovins, depuis les années 70 (Taoudi et *al.,* 1984)(Ducrotoy et al., 2015). *B. abortus* bv 3 est le biovar dominant dans plusieurs pays africains (Nigeria, Gambie, Kenya, Sénégal, Togo, Niger, Mali et Rwanda)(Akakpo and Ndour, 2013; Bankole et al., 2010; Bertu et al., 2015; Boukary et al., 2014; Muendo et al., 2012). Ce biovar est aussi retrouvé dans les pays euro-méditerranéens comme l'Italie (De Massis et al., 2014), la France(Garin-Bastuji and Delcueillerie, 2001), l'Espagne (Rodriguez-Torres et al., 1984) et la Turquie (Refai, 2002).

Il faut souligner que le laboratoire de référence des Brucelloses en France (ANSES) rapporte l'identification de *B. abortus* bv 3 chez un cas de brucellose humaine importée d'Algérie en 2003 (Garin- Bastuji, 2004 ; Cloeckaert et al., 2003). En Algérie, jusqu'à présent, aucune souche humaine de *B. abortus* bv 3 n'a été identifiée.

B. melitensis bv 2 vient en deuxième position, c'est également la première fois que ce biovar est identifié en Algérie. *B. melitensis* bv 2 est retrouvée en majorité à l'Ouest du pays (plus du tiers des souches isolées). Toutes ces souches ont été isolées dans le lait et/ou les ganglions mammaires. Il faut souligner que 3 souches ont été isolées chez des vaches dépistées suite à une enquête menée après déclaration de cas humains, dans la wilaya de Tlemcen (communes de Sidi Abdelli et Terny). Une seule souche a été isolée au Centre, dans la wilaya de Blida (commune de Bouaarfa) dans le lait d'une vache de 6 ans. C'est la première fois que ce biovar est identifié au Maghreb, mais on le retrouve dans le bassin méditerranéen, essentiellement en Espagne (Rodriguez-Torres et al., 1984), Italie (De Massis et al., 2014), Turquie et dans les pays du Moyen Orient (Benkirane, 2006; Refai, 2003).

B. melitensis bv 3 vient en troisième position ; pourtant jusqu'à notre étude, il était admis que c'était le biovar exclusif en Algérie, vu les données très réduites qu'on avait sur le plan bactériologique qui se résumaient à deux études qui ont isolé *B. melitensis* bv 3 (Boudilmi et al., 1990 ; Aggad et al., 2006), appuyées par les données du laboratoire sur les souches

humaines provenant de différentes wilayas du pays, qui étaient toujours identifiées à *B. melitensis* bv 3 (Korichi et al., 2005).

B. melitensis 3 est le biovar prédominant dans le bassin méditerranéen et au Maghreb. La majorité des cas humains au Maghreb sont dus à ce biovar (Benzarti et al., 2009; Boudilmi et al., 1990; Chaabani, 1995; El Idrissi, 1996; Lounes et al., 2014). Dans les pays voisins, il a été identifié chez les petits ruminants, dans la région orientale du Maroc, provinces aux frontières algéro-marocaines (El Idrissi, 1996); et au centre ouest et sud ouest de la Tunisie, aux frontières algéro-tunisiennes(Chaabani, 1995, Benzarti et al., 2009).
Ce biovar a été isolé chez les bovins et les petits ruminants au sud de la France (Verger et al, 1989) et au sud de l'Italie (De Massis et al., 2014), en Espagne (Rodriguez-Torres et al., 1984), ainsi qu'en Turquie (Leyla et al., 2003).

Une seule souche de *B. abortus* 2 a été isolée dans la région centre, dans la wilaya de Médéa (commune de Bouchrahil), chez une vache de population locale présentant un avortement, dépistée dans le carde d'une enquête PFE. C'est également la première fois que ce biovar est isolé en Algérie et dans la région du Maghreb. Ce biovar a été isolé en France entre les années 1982 et 1992, puis il n'a plus été retrouvé (Garin-Bastuji and Delcueillerie, 2001). Actuellement, il est isolé dans le continent Américain (USA, Amérique Centrale, Mexique, Brésil et argentine) (Acha and Szyfres, 2005) (Moreno, 2002) (Poester et al., 2002) Godfroid et al., 2011; Samartino, 2002), également retrouvé en Chine Deqiu et al., 2002, en Iran (Benkirane, 2006; Refai, 2003) et en Turquie (Leyla et al., 2003). Ce biovar aurait pu être importé de la France, vu que l'Algérie importe des bovins depuis les années 70 d'Europe, essentiellement de France. Il faut savoir dans ces mêmes années, une étude menée sur des bovins importés a révélé que 10% des animaux étaient séropositifs (Benaissa et Benaouf, 1982).

Dans notre étude l'âge, la race et le type de prélèvements ne semble pas influencer les espèces ou les biovars isolés. Par contre, la majorité des souches associées à un avortement (91%) sont des *B. abortus*, 9% sont des *B. melitensis.* Les souches associées aux rétentions placentaires et à l'arthrite sont également des *B. abortus.* Ce qui confirmerait que *B. abortus* est l'espèce la plus virulente chez les bovins.

Sensibilité aux antibiotiques

Les Quatre vingt six souches de *Brucella* identifiées au cours de notre étude à l'institut Pasteur d'Algérie, ont été testées par la méthode E-test à 6 antibiotiques préconisés dans le traitement de la brucellose humaine. Nous avons détecté 4 souches de *B. abortus* bv 3 résistantes à la streptomycine (7,3%).
Nous n'avons pas plus d'informations sur ces animaux, ni sur cet élevage, car ce sont des bovins prélevés au niveau de l'abattoir de Rouïba, venus pour un abattage sanitaire et accompagnés d'un ordre d'abattage qui contient très peu d'informations.

La littérature rapporte que la résistance acquise à ces antibiotiques est rare en clinique. Il est aisé de sélectionner in vitro des mutants résistants à la rifampicine (Maurin, 2007) . D'ailleurs,

il a déjà été signalé en Algérie, une antibiorésistance des souches humaines de *B. melitensis* bv 3 à la rifampicine (Benslimani et al., 2011/2012). En Tunisie, des souches humaines de *B. abortus* se sont révélées résistantes au Trimethoprime- sulfaméthoxazole (Zribi et al., 2009).

Cette antibiorésistance à la streptomycine pourrait être expliquée par le fait que, cet antibiotique est utilisé en pratique courante par les vétérinaires sur terrain pour de multiples affections touchant les bovins.

Détection du genre *Brucella* par la PCR en temps réel

Nous avons pu envoyer la moitié de nos prélèvements au laboratoire de référence des brucelloses (ANSES) pour effectuer une analyse avec les méthodes moléculaires.

Nous avons testé 84 prélèvements de ganglions lymphatiques par la méthode PCR-TR afin de détecter la présence du genre *Brucella*. Les résultats de l'analyse révèlent 32 prélèvements positifs, ce qui représente un taux de 38% contre 34,5 % pour la bactériologie. Ceci rejoint ce qui a été rapporté par Ilhan et *al.*, 2008 sur des prélèvements de ganglions lymphatiques, Hamdy et Amin, 2002 et Leal-Klevezas et *al.*, 1995 sur les prélèvements de lait.

Ce qui suggérerait que la PCR-TR serait plus sensible que la bactériologie, ceci pourrait être attribué au fait que la PCR détecte les microorganismes morts et vivants, puisqu'elle est basé sur la détection des ADN de *Brucella*, alors que la bactériologie détecte uniquement les microorganismes vivants. La PCR peut détecter un faible nombre de *Brucella* dans le prélèvement, qui ne peut être détecté par la bactériologie. La PCR peut aussi détecter les *Brucella*, lorsque le prélèvement est massivement contaminé puisqu'elle détecte les ADN spécifiques de *Brucella*.

Dans notre étude, nous avons testé 84 ganglions lymphatiques, dont 44 ganglions rétro-pharyngiens et 40 ganglions rétro-mammaires. Comme pour l'étude bactériologique, la PCR – TR détecte un taux de positivité plus élevé dans les ganglions rétro-mammaires. Ce qui suggèrerait que nous avons plus de chance d'isoler des *Brucella* dans les ganglions rétro-mammaires que dans les ganglions rétropharyngiens. Ce qui rejoint les constatations de Ilhan et *al.*, 2008, O'Leary et al., 2006 et Gupta et al., 2006 qui indiquent que les ganglions mammaires constituent le meilleur prélèvement pour la détection des *Brucella* en PCR.

La PCR –TR semble être un outil de diagnostic intéressant pour la brucellose puis qu'il augmente la sensibilité, surtout se réalise en un temps très court, contrairement aux méthodes bactériologiques qui prennent plusieurs jours et réduit le risque de contamination lors des manipulations.

V. CONCLUSION DE LA PARTIE I

En Algérie, la recherche bactériologique des *Brucella* est très peu rapportée, les études à cet égard sont très limitées. Ainsi, les connaissances des différentes souches circulantes dans nos élevages sont restreintes.

Notre étude rapporte pour la première fois les différentes espèces et biovars circulant dans les élevages bovins des quatre régions d'Algérie. En effet, il ressort de notre recherche, l'existence de *B. abortus* et *B. melitensis* chez les bovins algériens. Une dominance de *B. abortus* bv 3 est notée dans toutes les régions. On retrouve aussi, *B. abortus* bv 2 et *B. melitensis* bv 2 qui sont isolées pour la première fois dans la région maghrébine. On observe que *B. melitensis* bv 2 est en majorité isolée à l'Ouest du pays. Nous retrouvons aussi *B. melitensis* bv 3, qui a déjà été rapportée en Algérie chez les petits ruminants, le bovin et l'homme. Nous avons élaboré des cartes de la distribution des différentes souches isolées des quatre régions étudiées.

Trois quart des souches ont été isolées du lait et/ou des ganglions mammaires, ce qui constitue un sérieux problème de santé publique, vu les habitudes alimentaires de la population, qui apprécie le lait cru de vache. Ce problème est encore plus grave, puisque nous avons détecté une antibiorésistance des souches de *B. abortus* bv 3 à la streptomycine, qui constitue l'un des traitements préconisés pour la brucellose humaine.

L'analyse par PCR-TR des prélèvements de ganglions a rapporté une sensibilité plus élevée par rapport à la bactériologie, ce qui semble intéressant puisque cette méthode est plus rapide, plus simple et ne présente pas de danger pour le manipulateur. Mais cette dernière ne peut détecter que le genre *Brucella*, on ne pourra donc pas connaître l'espèce et le biovar.

PARTIE II

PARTIE II

Caractérisation moléculaire des *Brucella* par Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA)

Pour notre étude moléculaire, nous avons utilisé la méthode MLVA-16, décrite par Le Flèche et *al.*, 2006 et Al-Dahouk et *al.*, 2007. Les marqueurs ou loci sont organisés en Panels (panel 1 et 2). Le panel 1 regroupe les minisatellites avec 8 marqueurs , plus stable que le panel 2 qui regroupe les microsatellites avec 8 autres marqueurs (3 marqueurs pour panel 2A et 5 marqueurs pour panel 2B).

I. MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

a) Souches étudiées de *B. melitensis* bv 3

Un total de 90 souches *Brucella melitensis* bv 3, isolées entre 1989 et 2014 a été étudié. Une souche bovine isolée au cours de notre étude bactériologique, deux souches ovines et 87 souches humaines maghrébines (algériennes, marocaines et tunisiennes) issues de la collection du laboratoire de référence CNR/ OIE/ FAO/ UE des Brucelloses (ANSES) (voir tableau 6.1).

Les souches humaines ont été isolées à partir d'hémocultures, deux à partir d'une biopsie du disque intervertébral, deux du liquide synovial et une d'un abcès du psoas. La souche bovine a été isolée à partir des ganglions rétro-mammaires.
La majorité de ces souches humaines sont issues des cas importés d'origine Maghrébine, isolées en France :

- 56 souches algériennes, dont 8 souches reliées entre elles : des souches isolées du même patient (deux patients avec deux souches chacun : M021/M022 et M069/M070), d'une mère et son enfant (M029/M030), de patients de la même famille (M060/M062).
- 14 souches marocaines, dont 4 souches reliées entre elles : des souches isolées d'un mari et son épouse (M035/M036), d'un technicien de laboratoire et un patient (M001/M007).
- 13 souches tunisiennes, dont deux souches du même patient (M044/M049).
- 7 souches Maghrébines *largo sensu* (lorsque le pays d'origine n'est pas clairement déterminé), dont deux souches reliées d'un technicien de laboratoire et un patient (M024/M025).

Toutes les souches ont été confirmées comme *B. melitensis* bv 3, en utilisant la méthode microbiologique classique basée sur : la croissance en CO_2, production d'H_2S, hydrolyse de l'urée, agglutination des sérums monospécifiques, sensibilité aux colorants thionine et fuchsine et lysotypie (Alton et *al.*, 1988).

b) Souches de référence et contrôle de *B. melitensis* bv 3

Dans cette partie de l'étude, nous avons inclus les souches de référence : la souche *B. melitensis* bv 1 16 M (M093) et la souche *B. melitensis* bv 3 Ether (M092) (tableau 6.1). Une souche humaine *B. melitensis* bv 3 isolée en Turquie a été également incluse comme contrôle de l'analyse moléculaire.

c) Souches européennes de *B. melitensis* bv 3

Afin de déterminer les liens épidémiologiques possibles des souches *B. melitensis* bv 3 circulantes dans le bassin méditerranéen avec essentiellement les souches Européennes et au sein des souches Maghrébines, 507 génotypes MLVA-16 de souches publiées précédemment (Le Flèche et *al.*, 2006; Al Dahouk et *al.*, 2007 ; Marianelli et *al.*, 2007; Marianelli et *al.*, 2008; Valdezate et *al.*, 2010; Alvarez et *al.*, 2011; Garofolo et *al.*, 2013; Mick et *al.*, 2014) ont été ajoutés à l'analyse phylogénétique des lignées internationales.

d) Souches étudiées de *B. abortus* bv 3

Nous avons étudié 16 de souches de *B. abortus* bv 3, dont 15 souches bovines isolées au cours de notre étude bactériologique (nous avons choisi une souche par animal) ; et une souche humaine algérienne provenant de la collection du laboratoire de référence CNR/ OIE/ FAO/ UE des Brucelloses (ANSES) (voir Tableau 6.2).

Toutes les souches ont été confirmées comme *B. abortus* bv 3, en utilisant la méthode microbiologique classique basée sur : la croissance en CO_2, production d'H_2S, hydrolyse de l'urée, agglutination des sérums monospécifiques, sensibilité aux colorants thionine et fuchsine et lysotypie (Alton et *al.*, 1988).

e) Souches de référence

Dans cette partie de l'étude, nous avons inclus les souches de référence : la souche *B. melitensis* bv 1 16 M et la souche *B. abortus* bv 3 Tulya (Tableau 6.2).

f) Souches africaines et européennes de *B. abortus* bv 3

Afin de déterminer les liens épidémiologiques possibles des souches *B. abortus* bv 3 circulantes en Afrique et en Europe, 187 génotypes MLVA-16 de souches publiées précédemment : (Orsay database ; Bertu *et al.*, 2015 ; Le Flèche *et al*., 2006 ; Garofolo *et al*., 2013 ; Muendo *et al*., 2011 ; Kilic *et al*., 2011 ; M.P. Muñoz, CITA Zaragoza, Spain, (données personnelles)) ont été ajoutés à l'analyse phylogénétique des lignées internationales.

Tableau 6.1: Souches *Brucella melitensis* biovar 3 isolées à partir de différentes origines géographiques, étudiées dans cette étude et résultats des génotypes MLVA.

Code	Id Souche	Lien	Année	Hôte	Pays	Genre	Espèce	Bv	Lignée	MLVA8	MLVA11	MLVA-16
M001	14-195-380	M007 (patient)	2014	Humain	Maroc (Technicien)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	a
M002	13-06-37		2013	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	88	155	*
M003	13-55-202		2013	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	91	*
M004	13-717-1579		2013	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M005	13-762-1656		2013	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M006	13-2348-3996		2013	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M007	13-3383-8396	M001 (Technicien)	2013	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	a
M008	13-3841-9758		2013	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M009	12-0017-26		2012	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M010	12-0039-53		2012	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M011	12-2492-5347		2012	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	§	*
M012	12-2906-6073	M020 (patient)	2012	Humain	Algérie (Technicien)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M013	12-2916-6076		2012	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M014	12-3104-6836		2012	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M015	12-3218-7014		2012	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	$	*
M016	12-4523-9117		2012	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	a
M017	11-512-1322		2011	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	#11789 [&]	*
M018	11-1392-2557		2011	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	2006LeFlèche#086 [&]
M019	11-1544-3038		2011	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M020	11-2478-4373	M012 (Technicien)	2011	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M021	11-2673-4772	M022 (même patient)	2011	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	§	b
M022	11-2676-4776	M021 (même patient)	2011	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	§	b
M023	27/GM		2011	Bovin	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M024	10-366-1509	M025 (patient)	2010	Humain	Maghreb (Technicien)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	c
M025	10-367-1510	M024 (Technicien)	2010	Humain	Maghreb	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	c

M026	10-394		2010	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	91	*
M027	10-915		2010	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M028	10-1349		2010	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M029	10-1365	M030 (fils)	2010	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	d
M030	10-1366	M029 (mère)	2010	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	d
M031	10-2445		2010	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	$	*
M032	09-497-1031		2009	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M033	09-521-1131		2009	Humain	Maghreb? (Technicien)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M034	09-537-1148		2009	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M035	09-577-1245	M036 (épouse)	2009	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	*	*	*
M036	09-669-1401	M035 (mari)	2009	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M037	09-975		2009	Humain	Maghreb	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M038	09-1057		2009	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M039	09-1079-2065		2009	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M040	09-1162-2209		2009	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	#11789	*
M041	09-1166-2214		2009	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M042	09-1517-2957		2009	Humain	Maroc? (Maghreb)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	*	*
M043	09-1658-3209		2009	Humain	Algérie? (Maghreb)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	§	*
M044	08-17-36	M049 (même patient)	2007	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	e
M045	08-98-205		2008	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M046	08-983-1783		2008	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M047	08-2554-5444		2008	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	§	*
M048	07-717-1483		2007	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M049	07-1183-2851	M044 (même patient)	2007	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	e
M050	07-1197-2873		2007	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	91	*
M051	07-1390		2007	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M052	06-0157		2006	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M053	06-1012-1697		2006	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	f

M054	06-1352-2309	M055 (Technicien 1) ; M059 (Technicien 2)	2006	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	g
M055	06-1353-2310	M054 (patient); M059 (Technicien 2)	2006	Humain	Algérie (Technicien 1)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	g
M056	06-1530		2006	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	g
M057	06-1628-2750		2006	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	f
M058	06-1639		2006	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	f
M059	06-1742	M054 (patient); M055 (Technicien 1)	2006	Humain	Algérie (Technicien 2)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	g
M060	06-2224	M062 (même famille)	2006	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	h
M061	06-2272-ganglions		2006	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M062	06-2321	M060 (même famille)	2006	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	h
M063	06-2660		2006	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M064	05-2077		2005	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M065	05-2156		2005	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M066	05-2225		2005	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M067	05-2698		2005	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M068	05-2833		2005	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M069	05-2951	M070 (même patient)	2005	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	2007AlDahouk#018[l &]
M070	05-3028	M069 (même patient)	2005	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	2007AlDahouk#018[l &]
M071	05-3156	M072 (Technicien)	2005	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	i
M072	05-3434	M071 (patient)	2005	Humain	Algérie (Technicien)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	i
M073	05-3619		2005	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	2007AlDahouk#025 [&]
M074	05-4323		2002	Humain	Maghreb? (Technicien)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M075	04-1953		2004	Humain	Tunisie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M076	04-3016		2004	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	j
M077	04-3189		2004	Humain	Algérie? (Maghreb)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	2006LeFlèche#087 [&]
M078	04-3519		2004	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	91	*
M079	04-3960-6000		2004	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	j

M080	03-524		2002	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M081	03-2824		2003	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	*
M082	03-3559		2003	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	j
M083	03-4105		2003	Humain	Maghreb	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	d
M084	02-4188		2002	Humain	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M085	02-8197		2002	Humain	Maghreb?	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	2007AlDahouk#021 &
M086	02-8287		2002	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	92	*
M087	96-10539		1996	Ovin	Maroc	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	*
M088	92-7524-1		1992 ?	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	2006LeFlèche#096 &
M089	89-11818-1		1989	Humain	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	k
M090	89-11818-8		1989	Ovin	Algérie	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	94	k
M091	13-1994-3417		2013	Humain	Turquie	*Brucella*	*melitensis*	3	Est Méditerranée	43	125	*
M092	Ether		1965	Caprin	Référence (Italie)	*Brucella*	*melitensis*	3	Ouest Méditerranée	51	96	
M093	16M			Caprin	Référence (USA)	*Brucella*	*melitensis*	1	Amerique	47	136	

ND: Non déterminé; *: génotype unique nouvellement décrit dans cette étude; § et $: génotype MLVA-11 nouvellement décrit dans cette étude; a-l: génotype MLVA-16 partagé par plusieurs souches; &: base de données *Brucella* 2012.

Tableau 6.2: Souches de *Brucella abortus* biovar 3 étudiées

Code	Id souche	Lien	Espèce	Biovar	Hôte	Pays	Wilaya	Année	Origine souche
A01	03-1413		*B. abortus*	3	Humain	Algérie		2003	Anses
A02	04/GM	Même élevage (A03)	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Tizi Ouzou	2011	Thèse
A03	06/GM	Même élevage (A02)	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Tizi Ouzou	2011	Thèse
A04	09/GM		*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2011	Thèse
A05	10/GM		*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2011	Thèse
A06	19/GPh	Même élevage (A07, A08, A09, A10)	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2011	Thèse
A07	20/GPh	Même élevage (A06, A08, A09, A10)	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2011	Thèse
A08	21/GPh	Même élevage (A06, A07, A09, A10)	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2011	Thèse
A09	24/L	Même élevage (A06, A07, A08, A10)	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2011	Thèse
A10	25/GM	Même élevage (A06, A07, A08, A09)	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2011	Thèse
A11	26/GM		*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2011	Thèse
A12	28/L		*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Blida	2012	Thèse
A13	37/GM		*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Tizi Ouzou	2012	Thèse
A14	38/GPh	Même bovin (A15) prélèvement ganglions rétro-pharyngiens	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2012	Thèse
A15	38/L	Même bovin (A14) prélèvement lait	*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Béjaia	2012	Thèse
A16	39/GM		*B. abortus*	3	Bovin	Algérie	Tizi Ouzou	2012	Thèse
A17	Tulya		*B. abortus*	3		Référence (Uganda)			
A18	16 M		*B. melitensis*	1		Référence (USA)			

2. Extraction des ADN

Les extractions d'ADN sont préparées en utilisant le kit commercial « High Pure PCR Template Preparation Kit » (HPPTPK) selon les instructions du fournisseur (Roche Diagnostics, France).

Une suspension bactérienne homogène calibrée à 10^9 UFC/mL est préparée dans 5 mL de tampon PBS (~une oëse de 1 µL chargée dans 5 ml de PBS). Un aliquot de 200 µL de cette suspension est prélevé et 5 µL de lysosome y sont ajoutés, puis incubés à 37°C pendant 15 min. Une solution de lyse, contenant 40 µL de protéinase K et 200 µL de « binding buffer », est ajoutée. Le mélange est incubé à 70°C pendant 10 min.

Après la lyse, les étapes suivantes du protocole peuvent être réalisées dans le laboratoire de biologie moléculaire, comme suit :

- Additionner 100 µL d'isopropanol au produit de lyse.
- Transvaser dans des tubes à filtre (colonne) associés à des tubes de récupération et centrifuger 1 min à 8000 g. Le filtrat est éliminé.
- Ajouter 500 µL de tampon inhibiteur et centrifuger 1 min à 8000 g, le filtrat est éliminé.
- Ajouter 500 µL de tampon de lavage et centrifuger 1 min à 8000 g, le filtrat est jeté.
- Ajouter 500 µL de tampon de lavage et centrifuger 1 min à 8000 g, le filtrat est jeté.
- Centrifuger 10 secondes à vitesse maximale pour éliminer les résidus de tampon de lavage.
- Jeter les tubes de récupération et remplacer par des eppendorfs propres.
- Ajouter 200 µL de tampon d'élution (préalablement chauffé à 70°C dans un bain marie) et centrifuger 1 min à 8000 g.
- le tube eppendorf contient l'ADN élué.

La concentration d'ADN obtenue à partir d'une suspension bactérienne initiale calibrée à 10^9 UFC/mL avec le kit Roche est ~ 50 µg/mL. L'ADN sera conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

3. MLVA-16

Les amplifications sont réalisées en simplex, c'est-à-dire que chaque locus est amplifié par PCR classique et visualisé dans un gel d'agarose de façon individuelle, suivant une adaptation du protocole proposé par LeFlèche *et al*., 2006.

a) Calibration des ADN

Une quantité de 10 ng dans un volume réactionnel final de 25 µL est suffisante par réaction d'amplification.
Les ADN extraits par le kit Roche (~ 50 µg/mL) sont ainsi dilués au 1/10, soit 10 µL d'ADN dans 90 µL d'eau ultra pure.
Concernant les ADN des souches de référence, le protocole d'extraction utilisé est un protocole classique par phénol/chloroforme, dont le rendement oscille de 1500 à 3000

µg/mL. Des solutions de travail d'une concentration de 10 µg/mL sont préparées dans de l'eau ultra pure. Afin de les inclure dans nos mélanges réactionnels, nous réalisons donc des dilutions ½, soit 25 µL des ADN des souches de référence à 10 µg/mL dans 25 µL d'eau ultra pure.

b) Préparation des amorces

Les amorces oligonucléotidiques sens (forward) et anti-sens (reverse) (tableau 6.3) sont préparées à une concentration de travail de 3 µM, en diluant 10µL d'amorce à 100 µM dans 323 µL d'eau ultra pure.

Tableau 6.3 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude (Le Fleche et al., 2006)

VNTR	Amorce supérieure	Amorce inferieure
Bruce 04 BRU1543_8bp_152bp_2u	CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG
Bruce 06 BRU1322_134bp_408bp_3u	ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG	GCGTGACAATCGACTTTTTGTC
Bruce 07 BRU1250_8bp_158bp_5u	GCTGACGGGGAAGAACATCTAT	ACCCTTTTTCAGTCAAGGCAAA
Bruce 08 BRU1134_18bp_348bp_4u	ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC
Bruce 09 BRU588_8bp_156bp_7u	GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG
Bruce 11 BRU211_63bp_257bp_2u	CTGTTGATCTGACCTTGCAACC	CCAGACAACAACCTACGTCCTG
Bruce 12 BRU73_15bp_392bp_13u	CGGTAAATCAATTGTCCCATGA	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC
Bruce 16 BRU548_8bp_152bp_3u	ACGGGAGTTTTTGTTGCTCAAT	GGCCATGTTTCCGTTGATTTAT
Bruce 18 BRU339_8bp_146bp_5u	TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG

VNTR	Amorce supérieure	Amorce inferieure
Bruce 19 **BRU324_6bp_163bp_18u**	GACGACCCGGACCATGTCT	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT
Bruce 21 **BRU329_8bp_148bp_6u**	CTCATGCGCAACCAAAACA	GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT
Bruce 30 **BRU1505_8bp_151bp_6u**	TGACCGCAAAACCATATCCTTC	TATGTGCAGAGCTTCATGTTCG
Bruce 42 **BRU424_125bp_539bp_4u**	CATCGCCTCAACTATACCGTCA	ACCGCAAAATTTACGCATCG
Bruce 43 **BRU379_12bp_182bp_2u**	TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT	TATTTTCCGCCTGCCCATAAAC
Bruce 45 **BRU233_18bp_151bp_3u**	ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG
Bruce 55 **BRU2066_40bp_273bp_3u**	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT

c) Master mix

Le mélange réactionnel d'amplification utilisé pour une réaction comporte des 0,2 µM de dNTP, 5 µM des deux amorces, 0,2 µM de Taq DNA polymerase (GO Taq, Promega), le tampon de réaction à 5X (incluant le $MgCl_2$ et le tampon de charge) et 10 ng d'ADN dans un volume final de 25 µL.

Le programme d'amplification utilisé, montré ci-dessous, est commun à l'ensemble des marqueurs étudiés:

Programme	
95°C 2min	
96°C 30sec 60°C 30sec 70°C 1min	30 cycles
70°C 5min 12°C +∞	

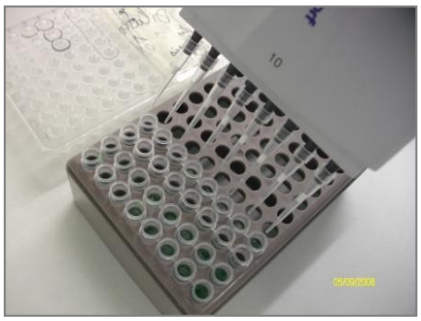
4. Electrophorèse

Des gels d'agarose à forte concentration de 3 %, constitués de SeaKem GTG agarose® / MetaPhor® (w /w) (Lonza, France) pour le panel 2 et de SeaKem GTG agarose®/ Agarose Normale (w /w) pour le panel 1 sont préparés dans du tampon TBE 0.5X. Cinq gouttes du révélateur « GelRed Nucleic Acid Gel Stain sont ajoutées.

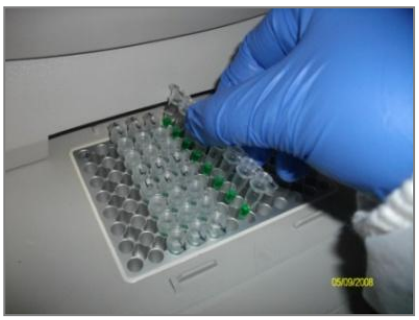
Un volume de 4 ou 5 µL d'amplicon est déposé en fonction de la largeur des peignes utilisés. Des marqueurs de poids moléculaire 20 bp et/ou 50 bp (5 ou 6 µL selon les peignes) sont ajoutés afin de déterminer la taille des fragments.
Les migrations sont réalisées en TBE 0.5X à 60 V pendant toute la nuit pour les gels Metaphor/ Seakem GTG, et à 50 V durant toute la nuit pour les gels Seakem GTG/Agarose Normale.

(a) Le Master mix

(b) Distribution du master mix dans chaque puits

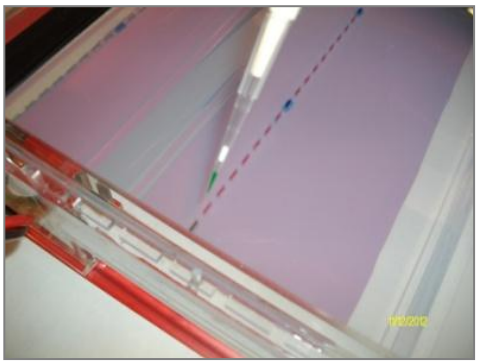


(c) Dépôt des ADN dans la microplaque de PCR

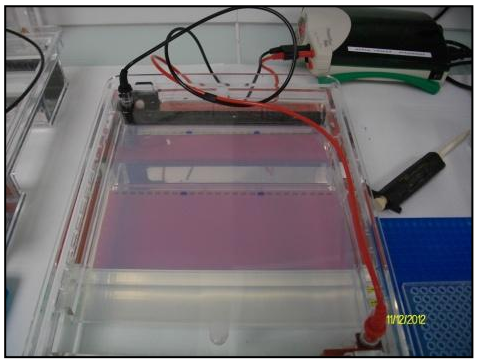


(d) Mise de la microplaque dans le thermocycleur

(e) Thermocycleur



(f) Dépôt des ADN



(g) Migration en gel

Figure 6.1 : Les étapes de la méthode MLVA

5. Lecture et interprétation

Un analyseur d'image (Gel Doc XR System, BioRad) couplé au logiciel Quantity One (BioRad) permet de visualiser le gel en photo. Les bandes sur les gels sont analysées visuellement.
La taille des allèles (en bp) est convertie en nombre de copies ou unités (u) pour chaque locus des deux panels 1 et 2 selon la table d'assignement des allèles (Le Flèche et *al.*, 2007 modifié juin 2009) (cf. annexe 5).
La mesure de la taille de ces amplicons permet d'assigner à une souche une série de nombres correspondant au nombre d'unités répétées à chaque locus. Ainsi, nous obtenons le profil des souches étudiées que nous pouvons comparer.

6. Identification des génotypes de *Brucella*

Pour l'identification des génotypes MLVA des souches étudiées et pour comparer aux autres profils de *Brucella* déjà publiés, nous avons utilisé la base de données *Brucella* 2012 (Orsay, France) (http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/).

7. Calcul de l'index de diversité

Dans notre étude, nous avons calculé l'index de diversité Hunter-Gaston (HGDI) de chaque locus, en utilisant l'outil V-DICE (**V**NTR **DI**versity and **C**onfidence **E**xtractor) http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl.

L'index de diversité appliqué aux données VNTR est une mesure de la stabilité de chaque locus. Il peut varier de 0 (pas de diversité) à 1 (diversité extrême).

8. Elaboration des dendrogrammes

Les génotypes MLVA sont analysés par le logiciel BioNumerics v 6.6 (Applied Maths, Belgium). Des dendrogrammes sont construits sur la base des matrices de distance qui prennent en compte le nombre de différences des allèles entre les différentes souches en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method Algorithm) ou MST (Minimum Spanning Tree).
Ces matrices de distance sont pondérées en accord avec leur horloge moléculaire. En effet, selon l'évolution moléculaire, les poids de 2, 1 et 0.1 respectivement pour le panel 1, panel 2A et panel 2B sont affectés aux différents loci (Al Dahouk *et al*., 2007).

II. Caractérisation moléculaire des souches de *B. melitensis* bv 3

A. RESULTATS

Un total de 90 souches de *B. melitensis* bv 3, isolées de 87 humains, deux ovins et un bovin a été caractérisé par la technique MLVA-16 (panel 1, 2A et 2B). Ces souches isolées durant une période de 25 ans (de 1989 à 2014), sont originaires d'Algérie (56), du Maroc (14), de Tunisie (13) et au sens large du Maghreb quand l'origine exacte est indéterminée (7).

1. Robustesse de la méthodologie MLVA-16 appliquée à notre étude

Tous les loci ont pu être amplifiés pour toutes les souches étudiées (Fig. 6.2 et 6.3).

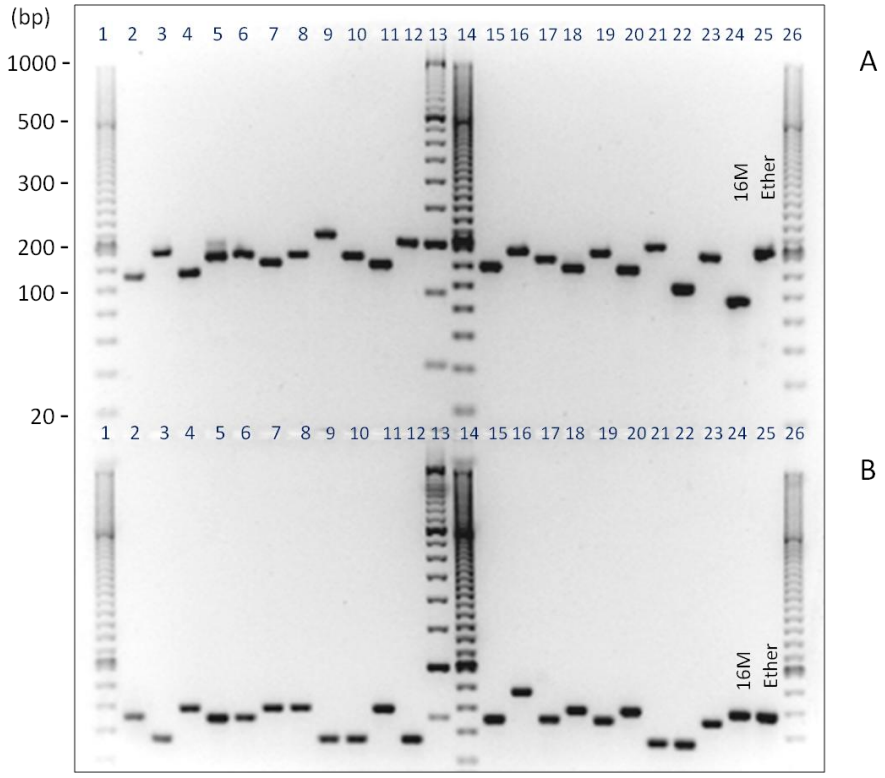


Figure 6.2 : Amplification des loci du panel 2B ; (A) Bruce 04; (B) Bruce 07

Souche de référence 16M (puits 24) ; souche de référence Ether (puits 25) ; marqueur de taille moléculaire 20bp (puits 1, 14 et 26) ; marqueur de taille moléculaire 50bp (puits 13)

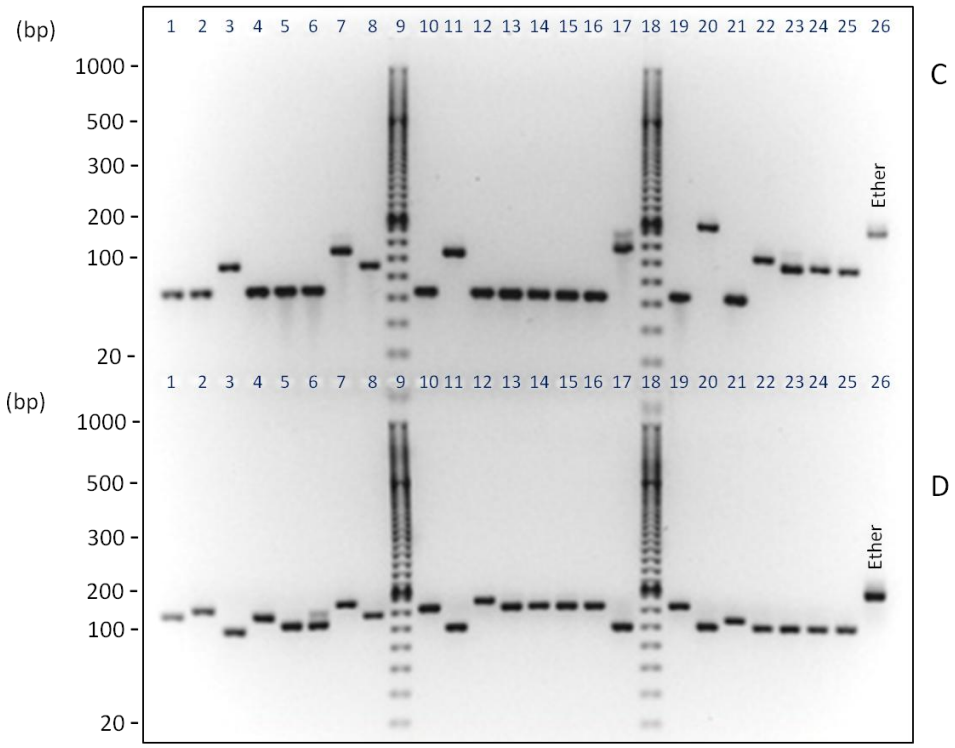


Figure 6.3 : Amplification des loci du panel 2B ; (C) Bruce 09 ; (D) Bruce16

Souche de référence Ether (puits 26) ;
Marqueur de taille moléculaire 20bp (puits 9 et 18)

a) Diversité génétique

L'évaluation du pouvoir discriminant pour chacun des loci a été réalisée par le calcul de l'index de diversité (HGDI). Nos résultats sont présentés dans le tableau 6.4.

Les loci du panels 1 et 2A montrent très peu de diversité, tandis que le panel 2B révèle un pouvoir discriminant très élevé. En effet, les valeurs de l'index de diversité (HGDI) sont comprises de 0.000 à 0.022 pour le panel 1, de 0.022 à 0.585 pour le panel 2A et de 0.000 à 0.802 pour le panel 2B.

Les loci du panel 1, ainsi que le locus Bruce21 du panel 2A montrent, dans notre étude, des valeurs très faibles qui tendent vers le zéro, et ne présentent ainsi aucun pouvoir discriminant pour la situation épidémiologique des souches étudiées. De même, le locus Bruce30 du panel 2B ne révèle aucun pouvoir discriminant pour les souches étudiées, avec une valeur HGDI = 0.000.

Les loci qui présentent la plus grande variabilité appartiennent au panel 2B, avec les valeurs HGDI suivantes : Bruce09 (0.802), Bruce16 (0.802), Bruce07 (0.800) et Bruce04 (0.782).

Tableau 6.4: Valeurs HGDI pour *B. melitensis* bv 3 de chaque marqueur génétique MLVA-16 (à partir de cette étude et de données publiées)

	Locus	HGDI à partir des résultats de cette étude				Global HGDI*			
		Index Diversité (*n=90*)	**Intervalle de confiance**	**K**	**max(pi)**	**Index Diversité** (*n*)	**Intervalle de confiance**	**K**	**max(pi)**
Panel 2B	Bruce04	0.782	0.743 - 0.821	8	0.311	0.765 (*507*)	0.745 - 0.785	10	0.377
	Bruce07	0.800	0.767 - 0.834	7	0.311	0.676 (*507*)	0.641 - 0.710	10	0.518
	Bruce09	**0.802**	0.731 - 0.874	14	0.411	0.637 (*507*)	0.592 - 0.683	15	0.588
	Bruce16	**0.802**	0.770 - 0.834	7	0.300	**0.838** (*507*)	0.828 - 0.849	11	0.245
	Bruce30	0.000	0.000 - 0.077	1	1.000	0.693 (*507*)	0.664 - 0.721	7	0.480
Panel 2A	Bruce18	0.585	0.528 - 0.641	4	0.522	0.582 (*432*)	0.541 - 0.624	7	0.595
	Bruce19	0.542	0.475 - 0.609	3	0.589	0.577 (*432*)	0.540 - 0.615	7	0.583
	Bruce21	0.022	0.000 - 0.065	2	0.989	0.009 (*432*)	0.000 - 0.022	2	0.995
Panel 1	Bruce06	0.000	0.000 - 0.077	1	1.000	0.466 (*432*)	0.442 - 0.490	2	0.632
	Bruce08	0.022	0.000 - 0.065	2	0.989	0.085 (*432*)	0.049 - 0.121	4	0.956
	Bruce11	0.000	0.000 - 0.077	1	1.000	0.000 (*432*)	0.000 - 0.017	1	1.000
	Bruce12	0.000	0.000 - 0.077	1	1.000	0.093 (*432*)	0.056 - 0.131	3	0.951
	Bruce42	0.022	0.000 - 0.065	2	0.989	0.663 (*432*)	0.654 - 0.672	4	0.370
	Bruce43	0.000	0.000 - 0.077	1	1.000	0.504 (*432*)	0.479 - 0.529	4	0.595
	Bruce45	0.000	0.000 - 0.077	1	1.000	0.000 (*432*)	0.000 - 0.017	1	1.000
	Bruce55	0.000	0.000 - 0.077	1	1.000	0.466 (*432*)	0.442 - 0.490	2	0.632

Hunter Gaston Diversity Index (HGDI): Mesure de la variation du nombre de répétitions à chaque locus. Oscille de 0.0 (pas de diversité) à 1.0 (diversité maximale); Intervalle de confiance: Précision de l'Index de Diversité, exprimés par les limites supérieures et inférieures à 95%; K: Nombre de différentes répétitions présentes à ce locus dans cet échantillon set; max(pi): Fraction d'échantillons qui présente le nombre de répétitions le plus fréquent dans ce locus (rang 0.0 à 1.0); n: nombre de souches selon le locus considéré; En gras: locus le plus variable (Lounes *et al*., 2014).

b) Pouvoir discriminant et agrégatif de l'outil MLVA-16

Dans notre étude, des souches connues pour être épidémiologiquement liées sont explorées. La plupart de ces souches ont présenté un génotype MLVA-16 identique tels que (voir fig.6.6 et tableau 6.1):

- des souches isolées de différents prélèvements d'un même patient (M021/ M022 ; M044/M049; M069/M070),
- des souches isolées de techniciens de laboratoire qui ont le même génotype MLVA que des patients (M001/M007 ; M012/M020 ; M024/M025 ; M054/M055/M059; M071/M072),
- des patients de la même famille (M060/M062), exemple d'une mère et son fils qui ont contracté la brucellose probablement par consommation d'un même produit laitier non pasteurisé (M029/M030).

De plus, il est intéressant de noter que des souches dont aucun facteur épidémiologique commun n'a été rapporté présentent des profils identiques (voir fig. 6.6) :

- Les souches M089 et M090, isolées en Algérie durant la même année (1989), à partir d'un humain et d'un ovin.
- Les souches M076, M079 et M082, isolées à partir de trois cas importés d'Algérie, deux durant l'année 2004 et un en 2003.
- Les souches M053, M057 et M068, isolées à partir de deux cas importés d'Algérie, un en 2005 et le second en 2006, et un cas importé de Tunisie durant la même année (2006).
- La souche M083, isolée d'un cas importé du Maghreb en 2003, est identique aux souches isolées en 2010, d'Algérie, chez une mère et son fils (M029/M030).
- La souche M016, isolée d'un cas importé d'Algérie en 2012, est identique aux souches isolées chez un patient marocain et un technicien de laboratoire, en 2013 et 2014 (M001/M007).
- La souche M056, isolée d'un cas importé d'Algérie en 2006, est identique aux souches isolées chez un patient algérien et deux techniciens de laboratoire, durant la même année (M054/M055/M059).

En revanche, nos résultats mettent également en évidence que certaines souches qui ont un lien épidémiologique établi présentent des petites variations dans leurs profils MLVA. En effet, le typage MLVA montre que les génotypes des souches isolées d'un mari (M035) et son épouse (M036) ont une différence de 1U dans le locus Bruce 42 (panel1), 2U dans le

locus Bruce18 (panel 2A) et 4U dans le locus Bruce 09 (panel 2B). Et de façon encore plus surprenante, des souches isolées d'un patient et d'un technicien de laboratoire contaminé directement à partir du prélèvement de ce patient (M012/M020) montrent deux génotypes distincts avec une différence de 1U dans deux loci (Bruce04 et Bruce07) du panel hypervariable 2B (voir tableau 6.1 et fig. 6.6).

2. Analyse des possibles relations phylogéographiques

a) Schéma MLVA-8

Les résultats sont présentés dans le tableau 6.1. Sur les 90 souches maghrébines étudiées, les loci du panel 1 (MLVA-8) permettent d'identifier trois génotypes différents : le génotype 51 pour 88 souches (98%), le génotype 88 pour une souche (souche d'un patient algérien isolée en 2013 (M002)) (1%) et un nouveau génotype pour une souche (1%) d'un patient marocain, isolée en 2009 (M035), qui diffère du génotype 51 par la variation d'un seul locus Bruce 42 (différence d'une unité). Tous les génotypes sont inclus dans le groupe "Ouest-méditerranéen".

b) Schéma MLVA-11

Les résultats sont présentés dans le tableau 6.1. Le schéma MLVA-11 (composé des huit loci du panel 1 et les trois du panel 2A) différentie les souches en 10 génotypes différents, correspondant à 6 génotypes décrits dans la base de données d'Orsay 2012 et 4 nouveaux génotypes. Les génotypes prédominants sont le génotype 92 avec 34 souches (37.8 %) et le 94 avec 29 souches (32,2 %), suivis du génotype 96 avec 16 souches (17,8 %), du génotype 91 avec 4 souches (4,5 %), du génotype 155 avec une souche (1,1 %), un génotype similaire à des souches italiennes # 11789 (Garofolo *et al.*, 2013) (2 souches ; 2,2 %) et quatre nouveaux génotypes (5 souches, 5,6 % ; 2 souches, 2,2 % ; 1 souche, 1,1 % et 1 souche, 1,1 %). Tous ces génotypes appartiennent au groupe "Ouest-méditerranéen" (Fig. 6.4)

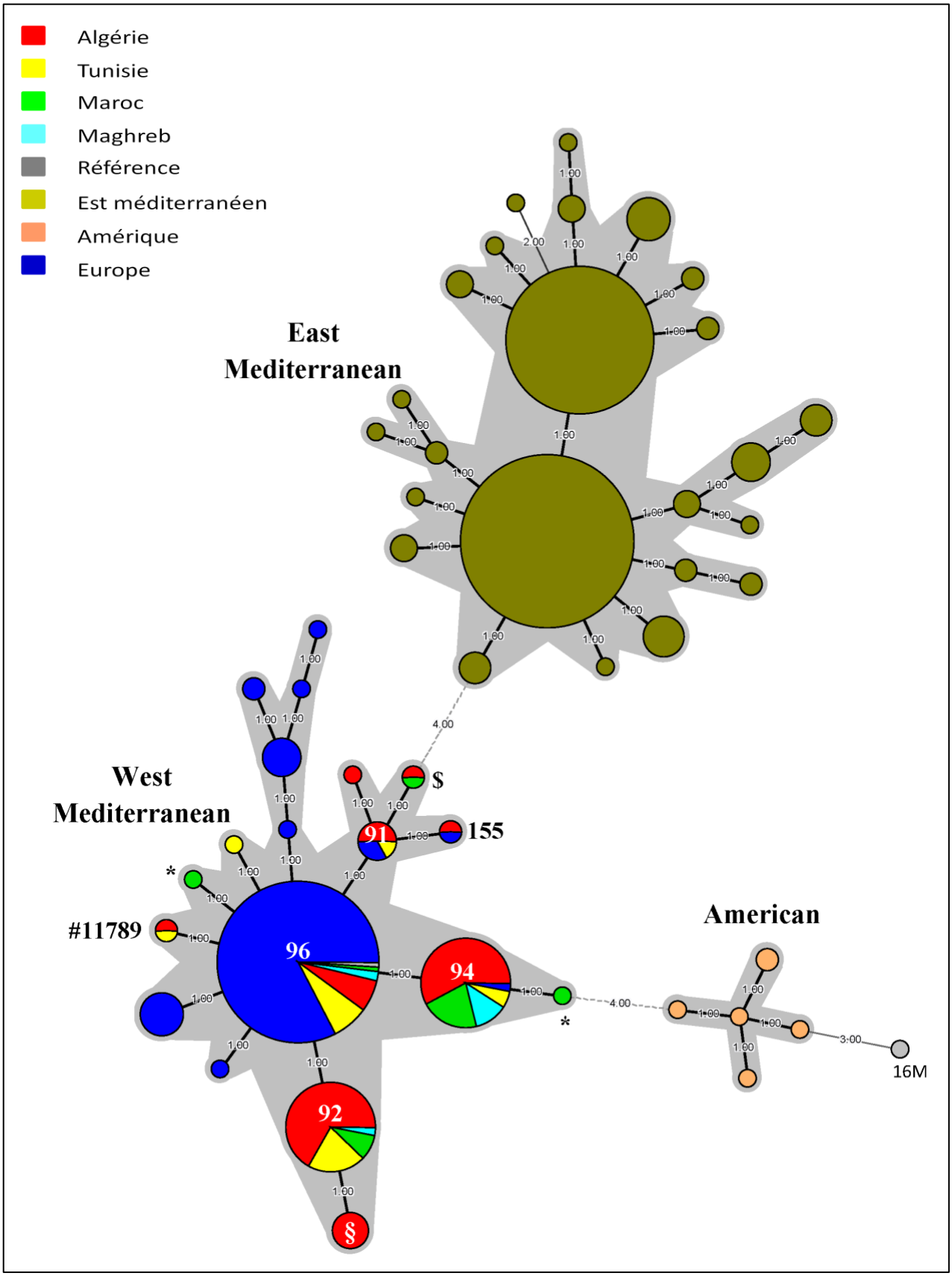


Figure 6.4 : MST des génotypes MLVA-11 des isolats *B. melitensis* bv 3 dans le monde

c) Schéma MLVA-16

Une grande diversité des souches maghrébines de *B. melitensis* bv 3 apparait lorsque nous ajoutons les 8 loci du panel 2 (2A et 2B). En effet, en utilisant tous les marqueurs MLVA-16 (marqueurs du panel 1 et 2), les 90 souches étudiées se répartissent en 55 génotypes différents.

i) Détermination des relations phylogénétiques des souches circulantes dans les pays du Maghreb

L'analyse du dendrogramme des 90 souches maghrébines de *B. me*litensis bv 3, basée sur les génotypes MLVA-16, ne révèle aucune association avec le facteur temps (année d'isolement des souches). Cependant, on observe un lien avec l'origine géographique. En effet, le lien phylogénétique des 90 souches maghrébines de *B. melitensis* bv 3 est révélé par MST (Minimum Spanning Tree) (Fig. 6.5). Ces résultats montrent que les souches algériennes se distribuent en 2 clusters distincts (clusters A et B), tandis que la majorité des souches marocaines et tunisiennes constituent des groupes distincts et indépendants.
L'un des clusters algériens (cluster A) est relié au groupe tunisien, alors que le second cluster algérien (cluster B) se rapproche du cluster marocain.

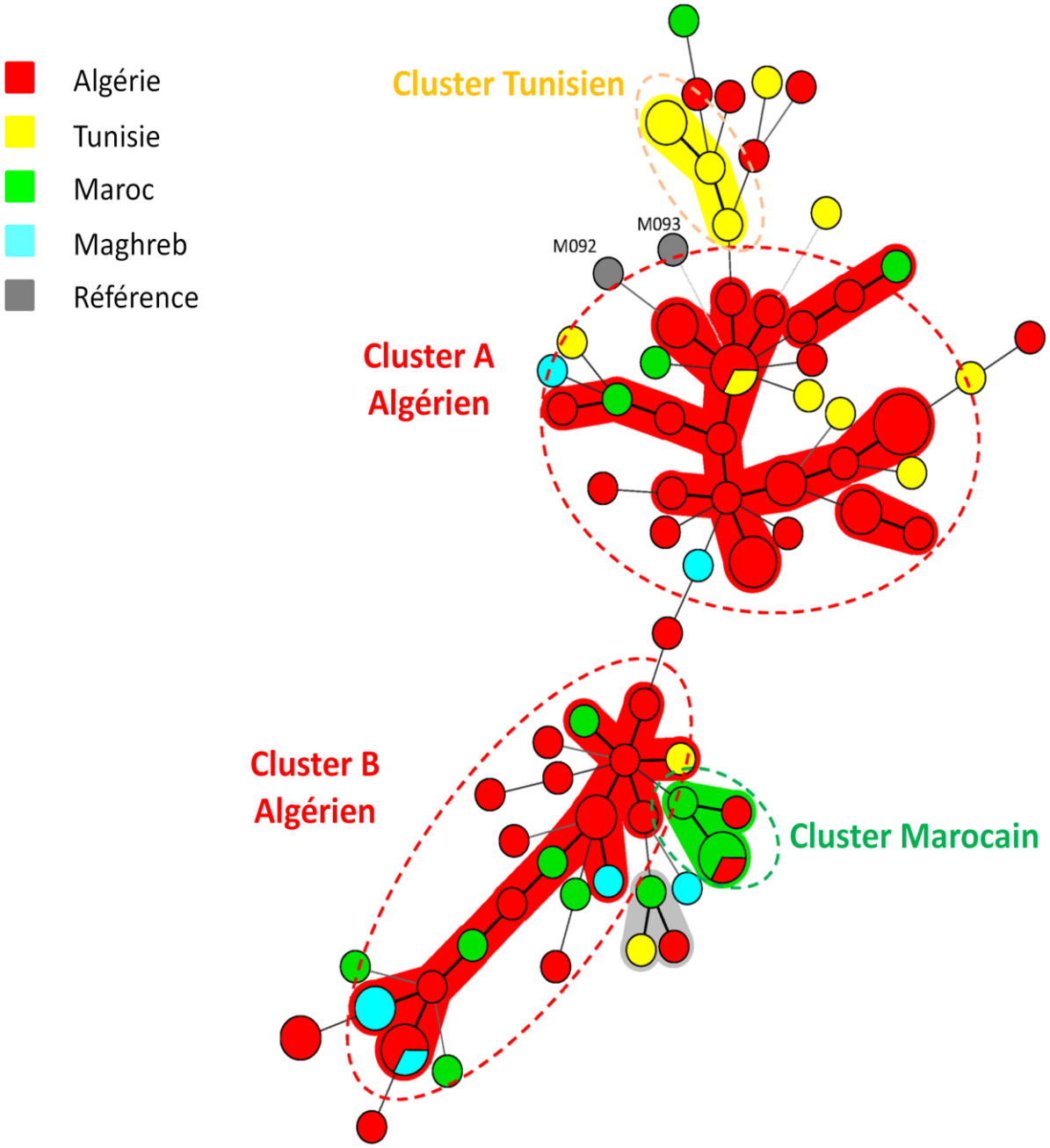


Figure 6.5 : MST des génotypes MLVA-16 des isolats Maghrébins.

ii) Relations phylogénétiques des souches maghrébines avec les souches françaises

Des génotypes MLVA-16 de souches françaises (n= 36) ont été ajoutés (Mick *et al.*, 2014 ; Mick, résultats personnels) pour construire un dendrogramme.
En excluant les souches de référence (clusters C et D), toutes les souches Maghrébines et françaises de *B. melitensis* bv 3 (n=126) se regroupent en 2 clusters : A et B (fig. 6.6), avec 91 souches (72.2%) et 35 souches (27.8%) respectivement. Avec un taux de similarité de 70%, le principal cluster A est subdivisé en 2 sous-clusters A1 (1 souche) et A2 (90 souches).
Les souches du cluster A2 sont distribuées en 2 groupes : le groupe A2.1 contenant 43 souches (34 %), essentiellement Maghrébines (Algériennes et Tunisiennes) et le groupe A2.2, avec 47 souches (37 %), principalement isolées de France.
Le cluster B contient exclusivement des souches Maghrébines, essentiellement algériennes et marocaines.

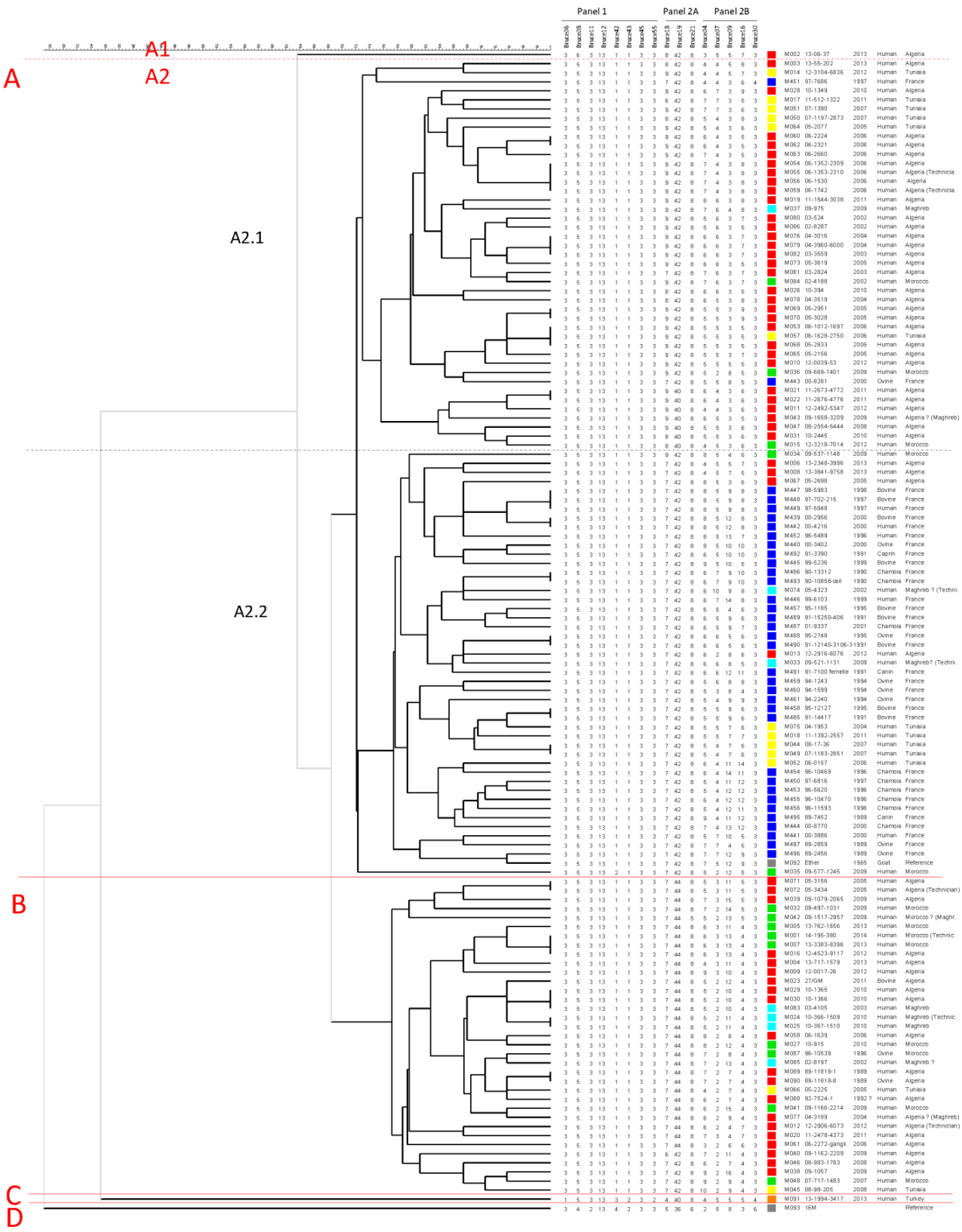


Figure 6.6 : Dendrogramme des génotypes MLVA-16 des souches Françaises et Maghrébines

iii) Détermination des relations phylogénétiques des souches maghrébines avec les souches internationales

L'analyse de 497 souches *B. melitensis* bv 3, incluant des souches publiées précédemment et les souches maghrébines de cette étude a été réalisée (Fig. 6.4 et Fig. 6.7).
Les génotypes se divisent en trois clusters : Ouest-méditerranéen, Est-méditerranéen et Américain, conformément aux résultats préalablement publiés par Al Dahouk et *al.*, 2007.
Comme attendu, le cluster Est-méditerranéen contient les souches isolées en Turquie (incluant M091), en Chine et en Grèce. Le cluster Ouest méditerranéen est quant à lui constitué des souches italiennes, espagnoles, françaises, suisses et des souches maghrébines de notre étude : algériennes, tunisiennes et marocaines.
Un focus plus attentif sur le cluster Ouest-méditerranéen permet de distinguer les deux clusters Magrébins A et B décrits précédemment (Fig. 6.5) qui sont liés au cluster européen constitué de souches françaises, italiennes et espagnoles.

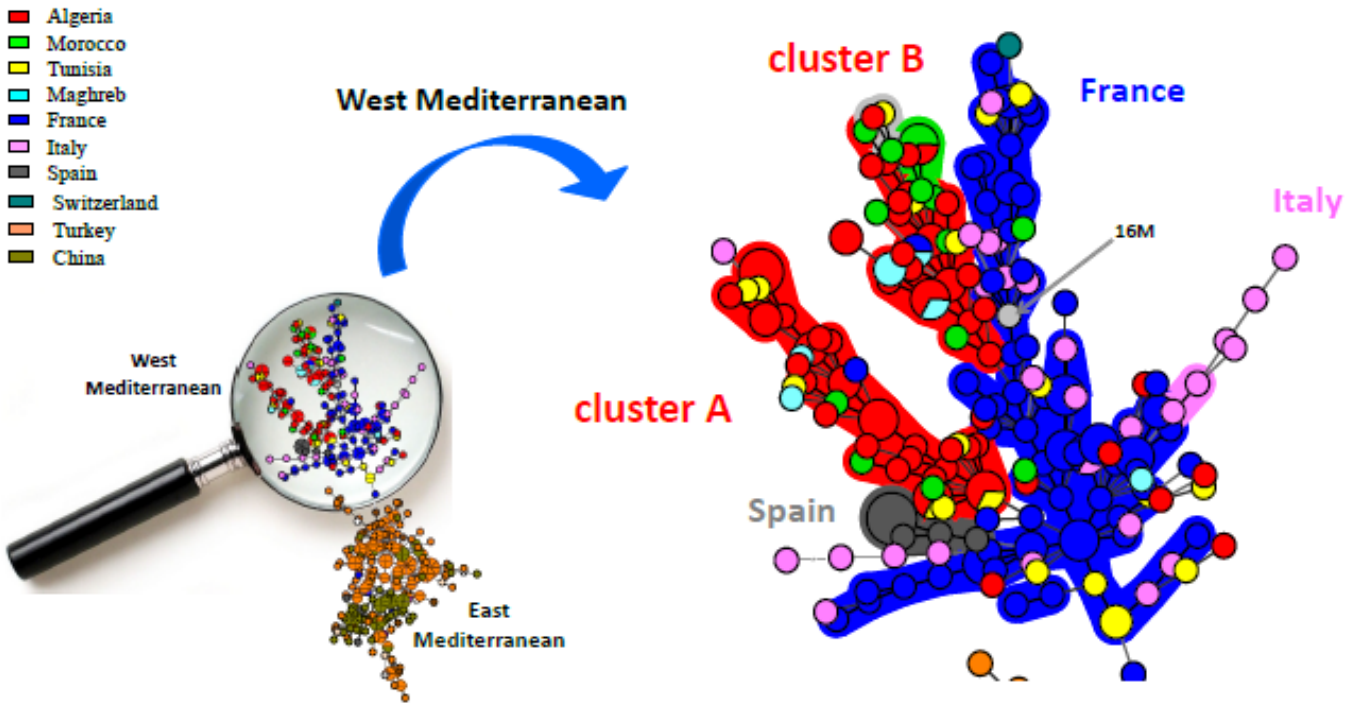


Figure 6.7 : MST des génotypes MLVA-16 des souches *B. melitensis* 3 dans le monde

Ces résultats confirment l'existence de lignées géographiques, dans lesquelles le cluster A algéro-tunisien se rapproche du cluster espagnol, tandis que le cluster B algéro-marocain semble être plus proche du cluster français et italien.
Parmi les 72 génotypes identifiés dans cette étude, certaines souches présentent des profils identiques à des génotypes déjà rapportés ou publiés précédemment (voir tableau 6.1):

- La souche M018 isolée en 2011 d'un cas importé de Tunisie a un génotype identique à celui d'une souche isolée en 1995, en Sicile (Italie), à partir d'un ovin, identifiée dans la base de données comme *B. melitensis* bv 2 (Flèche et *al.*, 2006).

- Les souches M069/M070 isolées en 2005 d'un cas importé d'Algérie ont un génotype similaire à celui d'une souche isolée en 2002 d'un patient tunisien (Al Dahouk et *al.,* 2007).

- La souche M073 isolée en 2005 d'un cas importé d'Algérie a le même génotype que celui d'une souche isolée en 1996 d'un patient algérien (Al Dahouk et *al.*, 2007).

- La souche M077 isolée en 2004 d'un cas importé d'Algérie a un génotype identique à celui d'une souche isolée en 1991 en Tunisie à partir d'un ovin (Le Flèche et *al.,* 2006).

- La souche M085 isolée en 2002 d'un cas importé du Maghreb a un génotype similaire à celui d'une souche isolée en 2003 à partir d'un patient à Nice en France (Al Dahouk et *al.,* 2007).

- La souche M088 isolée en 1992 d'un patient en Algérie a le même génotype qu'une souche isolée la même année en Algérie (Le Flèche et *al.,* 2006).

B. DISCUSSION

L'infection *à Brucella melitensis* est largement répandue au Maghreb, où elle a été décrite pour la première fois à la fin du 19ème siècle. A cette époque, les études indiquèrent que l'importation de chèvres maltaises et espagnoles infectées fût à l'origine de cette maladie (Sergent *et al*., 1807).

Actuellement, la brucellose sévit comme une zoonose endémique au Maghreb, où l'infection caprine constitue la principale cause des cas humains reliés aux habitudes alimentaires (consommation de lait cru et de produits laitiers artisanaux). Le contrôle de cette pathologie est très difficile à cause du mode d'élevage dans cette région (transhumance, mouvements d'animaux fréquents et incontrôlés, passage incontrôlé des frontières entre les pays du Maghreb).

B. melitensis bv 3 est le biotype dominant dans la région du Maghreb, fréquemment isolé dans les cas humains, rapporté comme la cause principale de la brucellose humaine en Algérie, Tunisie et au Maroc (Boudilmi *et al*, 1990; El Idrissi, 1996; Chaabani, 1995).

Notre étude MLVA-16 constitue la première étude de typage moléculaire des souches Maghrébines circulantes. Quatre-vingt-dix souches de *B. melitensis* bv 3, collectées essentiellement d'Algérie, Tunisie et Maroc durant 25 ans (1989 à 2014) sont ici caractérisées. Elles incluent des souches isolées en France à partir de cas importés de brucellose humaine provenant des pays maghrébins, avec un historique épidémiologique de ces patients connue (voyage ou séjour dans les pays du Maghreb, consommation de produits laitiers non pasteurisés, de fromage artisanal ou de lait cru dans les pays d'origine).

Robustesse de la méthodologie MLVA-16 appliquée à notre étude

Le schéma MLVA-11 (Panels 1 and 2A) permet de différentier les souches en 10 génotypes différents : les génotypes prédominants sont le 92 et le 94, observés précédemment pour des souches d'Algérie et de Tunisie (Le Flèche *et al.*, 2006; Al Dahouk et *al.*, 2007), suivis des génotypes 96 et 91, décrits déjà pour des souches italiennes (Garofolo *et al.*, 2013; Le Flèche *et al.*, 2006), et le génotype 155 pour une souche. Tous ces génotypes appartiennent au groupe "Ouest-méditerranéen".

Le schéma MLVA-16 révèle un grand pouvoir discriminant. En accord avec les index de diversité (HGDI), les panels 1 et 2A montrent une faible diversité. Néanmoins, le panel 2B est suffisant pour clustériser les souches en 55 génotypes différents.

Nos résultats confirment que l'approche MLVA-16 est un outil présentant un pouvoir discriminant satisfaisant, capable d'identifier les relations épidémiologiques existantes entre les souches *B. melitensis* dans des études à fine échelle (comparaison des souches au sein du Maghreb) et à large échelle (situation des souches Algériennes au niveau international).

Le pouvoir agrégatif de cette méthodologie a été démontré dans cette étude. Par exemple, les résultats MLVA ont confirmé les contaminations en laboratoire et les brucelloses intrafamiliales dues aux habitudes alimentaires.

Inversement, quelques souches isolées de régions différentes ou à des périodes de temps différentes, pour lesquelles aucun lien épidémiologique direct n'avait été identifié, présentaient des profils MLVA identiques. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

1) des liens épidémiologiques non décrits pourraient être alors envisagés : source d'infection commune, persistance durant des années dans certaines régions…;

2) ces profils identiques pourraient refléter la propagation des souches circulantes à travers des cadres spatio-temporels distincts (différentes périodes, différentes régions/pays), facilitée par les voyages (Memish et Balkhy, 2004) ;

3) ces similitudes pourraient être dues à des caractères homoplasiques, et ainsi refléter une évolution convergente.

Néanmoins, en dépit de l'efficacité de la MLVA-16 comme outil de génotypage, nos résultats rapportent que des isolats en liens (ex : patients de la même famille, patient/technicien) peuvent présenter des petites variations dans leurs profils MLVA. Ainsi, deux profils différents de souches (M035/M036) isolées chez des patients de la même famille (mari et son épouse) contaminés par ingestion de produits laitiers artisanaux durant leur séjour au Maroc présentent des différences sur trois loci: 1U dans Bruce42 (panel1), 2U dans Bruce18 (panel 2A) et 4U dans Bruce09 (panel 2B). De même, deux souches (M012/M020) isolées d'un patient et un technicien de laboratoire contaminé directement à partir du prélèvement de ce patient montrent des génotypes distincts : différence de 1U dans deux loci (Bruce04 et Bruce07). Ces petites variations sont probablement dues à des événements génétiques aléatoires, incluant des mutations ponctuelles, des insertions/délétions…. De plus, une double amplification, correspondant à deux allèles distincts sur les loci les plus variables génétiquement, a pu ainsi être observée occasionnellement dans un même isolat au cours de cette étude, reflétant un probable événement de mutation, généré par la réponse adaptative de la bactérie dans l'hôte. Cependant, face à des profils « trop » distincts (M035/M036), nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les deux patients se soient infectés par des sources différentes.

Nos résultats confirment que la MLVA-16 est un outil adéquat pour des études micro et macro-épidémiologiques des infections à *B. melitensis*.

Analyse des possibles relations phylogéographiques

La variété et la distribution des génotypes MLVA-16 ne semblent pas associées à une période spécifique de temps, suggérant ainsi la circulation simultanée de plusieurs souches au Maghreb.

Néanmoins, cette approche moléculaire met en évidence l'existence de profils géographiques. En effet, l'analyse phylogénétique des génotypes obtenus identifie deux principaux clusters: un cluster algéro-tunisien et un cluster algéro-marocain. Des mouvements frontaliers au niveau de la région ouest de l'Algérie et Maroc ou l'Est de l'Algérie avec la Tunisie pourraient expliquer ces proximités génétiques. L'absence de métadonnées, en particulier les données épidémiologiques, et le manque de connaissance du moment exacte de la contamination (la majorité des cas étant des cas importés en France avec aucune donnée recueillie sur la région exacte d'origine) ne permettent pas de confirmer cette hypothèse.

Cependant, les études épidémiologiques de la brucellose en Tunisie rapportent que la maladie touche toutes les régions du pays et particulièrement le Centre-Ouest et le Sud-Ouest aux frontières avec l'Algérie. Ainsi, 80 % des cas humains ont été déclarés dans les régions centre-ouest et sud-ouest, en corrélation avec le taux d'infection chez petits ruminants déclaré par l'OIE en 2009, qui est de 7,5%. Entre 1995 à 2011, l'incidence de la brucellose humaine en Tunisie variait entre 2 à 5 par 100 000 habitants, avec une moyenne de 320,5 cas par an (2001-2008)% (Chaabani, 1995 ; Benzarti *et al*, 2009).

Au Maroc, la situation épidémiologique des petits ruminants antérieure à 1996 reste mal connue. Un nombre élevé de foyers rapportés dans la région Est du pays (aux frontières avec l'Algérie) incita les autorités à mener une étude sérologique, qui révéla un taux de 12,1 % avec le test du rose Bengale et 7,5 % avec la fixation du complément. Il apparut que le taux d'infection chez les caprins était plus élevé que chez les ovins (El Idrissi *et al*, 1996). Concernant la brucellose humaine, une étude dans la population rurale rapporte une séroprévalence de 1,5 % en 1999 (Belahcen *et al*., 2002) et très peu de cas humains sont déclarés par le Maroc, de 0 à 5 cas par an, entre 2002 et 2006. Plus récemment, en 2011, l'OIE déclare un foyer de petits ruminants dans l'Est du pays et 16 cas humains (WAHID, 2011).

En parallèle, l'Algérie enregistre 10014 cas de brucellose humaine en 2010, ce qui représente une incidence de 28,04 cas pour 100000 habitants, avec des taux élevés dans les régions limitrophes avec les deux pays voisins :

- dans région Ouest : El Bayadh : 963 cas / 100000 habitants, Béchar : 298,58 cas pour 100000 habitants et Nâama : 321cas/100000 habitants
- dans la région Est : Tébessa : 41 cas/ 100000 habitants et Khenchela : 70 cas/100000 habitants) (REM, 2010).

Cette situation épidémiologique dans les pays maghrébins est due aux mouvements incontrôlés et des échanges commerciaux des animaux aux frontières, les animaux peuvent passer les frontières sans aucun contrôle lors du pâturage, des grands marchés à bestiaux dans les wilayas limitrophes, en plus du mode d'élevage, en particulier la transhumance.

Hypothèse sur l'origine de l'émergence de la brucellose au Maghreb et la diffusion de la maladie en Algérie

La première étude sur la brucellose humaine et animale au Maghreb en 1907 indique que l'origine de l'infection en Algérie, Tunisie et Maroc fût l'importation de chèvres maltaises et espagnoles (Sergent *et al*., 1908). Les chèvres maltaises furent importées de l'île de Malte (berceau de la brucellose) vers l'Algérie, la Tunisie et la Sicile en Italie (entre 1904 et 1909). Les chèvres espagnoles furent importées de Gibraltar vers l'Ouest de l'Algérie (Sergent *et al*., 1908). Cet historique pourrait expliquer et retracer l'origine et les voies de propagation des génotypes ancestraux des deux clusters maghrébins identifiés et aussi de leur rapprochement avec les souches italiennes et espagnoles. Ces résultats sont en accord avec la proximité géographique et avec les données historiques. Ainsi, ceci pourrait être illustré par nos résultats : la souche M018 isolée en 2011 d'un cas importé de Tunisie a un génotype MLVA identique à celui d'une souche isolée à partir d'un ovin en 1995, en Sicile (Italie).

Nos résultats concluent à l'existence de deux clusters maghrébins, dont l'un est en lien étroit avec le cluster français. Cette proximité repose sur des liens socio-économiques et historiques étroits entre la France et le Maghreb, particulièrement avec l'Algérie. En effet, l'Algérie importe des vaches gestantes de plusieurs pays européens mais principalement de France depuis les années 70 (Akakpo, 2009). Une étude sérologique menée à l'Est du pays sur des bovins importés révéla en 1978 que 10 % de ces animaux étaient infectés (Benaissa *et al*., 1984). De plus, les études de Verger *et al*. 1989 rapportèrent que les bovins du sud de la France étaient infectés par *B. melitensis* bv 3.

La comparaison des souches Maghrébines aux souches européennes indique que les souches Algériennes sont réparties en deux clusters distincts, un cluster algérien liées aux souches marocaines et très proche du groupe européen et un autre groupe algérien, plus proche des souches tunisiennes. Ces résultats suggèrent que ces deux sous-lignées pourraient refléter l'existence d'une lignée autochtone du Maghreb, ainsi qu'une "lignée historique", résultant des liens économiques, sociaux et historiques entre l'Algérie et l'Europe. Une étude antérieure d'électrophorèse en champ pulsé, réalisée à partir de souches françaises et algériennes, après restriction *Xhol* et *Xbal*, a déjà mis en évidence l'existence de deux lignées: une lignée algérienne autochtone et une lignée «coloniale» (Calvez *et al.,* 2001). Les anciens mouvements d'animaux infectés de l'Europe vers le Maghreb déjà décrits plus haut, pourraient être impliqués dans l'existence de cette lignée importée. Notre enquête, basée sur des méthodes plus discriminantes, semble appuyer cette hypothèse.

III. Caractérisation moléculaire des souches *B. abortus* bv 3

A. Résultats & Discussion

Nous avons étudié 16 souches de *B. abortus* bv 3, dont 15 souches bovines isolées de 14 vaches au cours de notre étude bactériologique et une souche humaine isolée par le centre de référence des brucelloses humaines (ANSES), à partir d'un cas de brucellose importée d'Algérie. Ces souches ont été caractérisées par la technique MLVA-16 (Al Dahouk et al., 2007).

Les génotypes des souches algériennes de *B. abortus* bv 3 de ntre étude ont été comparés à 187 génotypes MLVA de la littérature (africains et européens).

1. Pouvoir discriminant et agrégatif de l'outil MLVA-16 pour les études épidémiologiques des souches *B. abortus* bv 3

Dans notre étude, des souches épidémiologiquement liées ont été analysées. La plupart de ces souches ont présenté un génotype MLVA-16 identique tels que (voir fig.6.9 et tableau 6.2):

- Des souches isolées à partir des bovins du même élevage (A08, A09 et A10).

- Des souches isolées à partir des bovins du même élevage (A06 et A07).

De plus, il est intéressant de noter que des souches dont aucun facteur épidémiologique connu n'a été rapporté présentent des profils identiques (voir fig. 6.9) :

- Des souches isolées à partir des bovins d'élevages différents et de différentes wilayas (A13, A15 et A16). En effet, les souches A13 et A16 sont toutes les deux issues de la wilaya de Tizi Ouzou, mais chacune d'une commune différente (Azzaga et Makouda) qui ne sont pas voisines ou limitrophes. La souche A15 quant à elle, est issue de la wilaya de Béjaia, commune de Beni Djellil, qui n'est pas une commune limitrophe avec la wilaya de Tizi Ouzou.

- La souche A11 est identique aux trois souches A10, A09 et A08 issues du même élevage de la commune d'Oued Ghir. La souche A11 provient de la même wilaya Béjaïa, d'une commune voisine El Kseur.

Ces deux constatations pourraient témoigner des mouvements incontrôlés des animaux d'une wilaya vers une autres, d'une commune vers une autre et d'un élevage vers un autre, ainsi que de l'introduction de nouveaux animaux dans les élevages sans aucun contrôle préalable.

En revanche, nos résultats mettent également en évidence que certaines souches qui ont un lien épidémiologique établi présentent des petites variations dans leurs profils MLVA.

- Les souches A02 et A03 sont issues de deux vaches du même élevage, mais elles présentent

une variation de 1U dans le locus Bruce 12 (panel 1). Quand on s'intéresse au numéro d'identification de ces deux vaches, on découvre un code éleveur différent pour chacune, laissant supposer qu'elles ont été récemment achetées de deux éleveurs différents de la même wilaya.

- Les souches A06, A07, A08, A09 et A10 sont isolées des bovins d'un même élevage. Pourtant A06 et A07 sont identiques mais différentes de A08, A09 et A10 du même élevage par la variation de 1U dans le locus Bruce 16.

Encore plus surprenant les génotypes de deux souches isolées du même animal à partir de deux prélèvements différents : le lait et les ganglions rétro-pharyngiens (A14 et A15), présentent une variation de 1U dans le locus Bruce 16.
Chez les *Brucella*, plusieurs investigations portant sur des souches isolées d'un même foyer, voire d'un même patient/animal, ainsi que des expériences de stabilité *in vitro* de la souche vaccinale *B. melitensis* Rev1 (Garcia-Yoldi et *al.*, 2007 ; Maquart *et al*., 2009 ; Mick *et al*., 2014), ont rapporté l'instabilité génétique des loci MLVA-16. Les petites variations observées entre les profils MLVA de souches épidémiologiquement liées sont dues à des évènements génétiques aléatoires, incluant des insertions d'ADN, des délétions et des mutations ponctuelles (Vergnaud et Denoeud, 2000), générés par la réponse adaptative de la population microbienne à l'hôte.

Néanmoins, le schéma de génotypage MLVA permet de distinguer des souches non liées et d'agréger les souches connues comme épidémiologiquement connues. Cette stratégie moléculaire est donc considérée comme adéquate pour étudier les liens phylogénétiques et épidémiologiques existant entre les souches de *B. abortus* bv 3.

2. Schéma MLVA-11

Les résultats sont présentés dans la fig. 6.8. Le schéma MLVA-11 (composé des huit loci du panel 1 et les trois du panel 2A) sépare les souches en deux clusters distincts A et B :

Le cluster A regroupe toutes les souches européennes (France, Allemagne, Grèce, Italie, Espagne, Turquie), ainsi que toutes les souches algériennes bovines.

Le cluster B regroupe toutes les souches africaines (Kenya, Nigeria, Soudan), ainsi que la souche de référence Tulya qui est une souche africaine (Uganda) et la seule souche humaine de *B. abortus* bv 3 isolée d'un cas importé en France.

Ces résultats sont en accord avec la distribution des souches *B. abortus* préalablement proposée par Bertu et *al.*, 2015, avec l'existence d'un cluster européen et d'un cluster africain. L'originalité des souches de *B. abortus* bv 3 africaines a été démontrée, tant au niveau phénotypique (Verger et Grayon, 1984) que moléculaire (Ocampo-Sosa *et al*., 2005 ; Bertu *et al*., 2015). En effet, les souches *B. abortus* bv 3 africaines différent significativement du schéma classique de l'espèce *B. abortus* par leurs caractères culturaux, leur profil d'oxydation métabolique et certaines par une réponse négative à l'épreuve de l'oxydase.

Dans notre étude, il est important de signaler que les souches algériennes présentaient non seulement les caractéristiques phénotypiques classiques de ce biovar (Alton *et al*., 1988), mais également de noter leur proximité génétique avec les souches européennes.

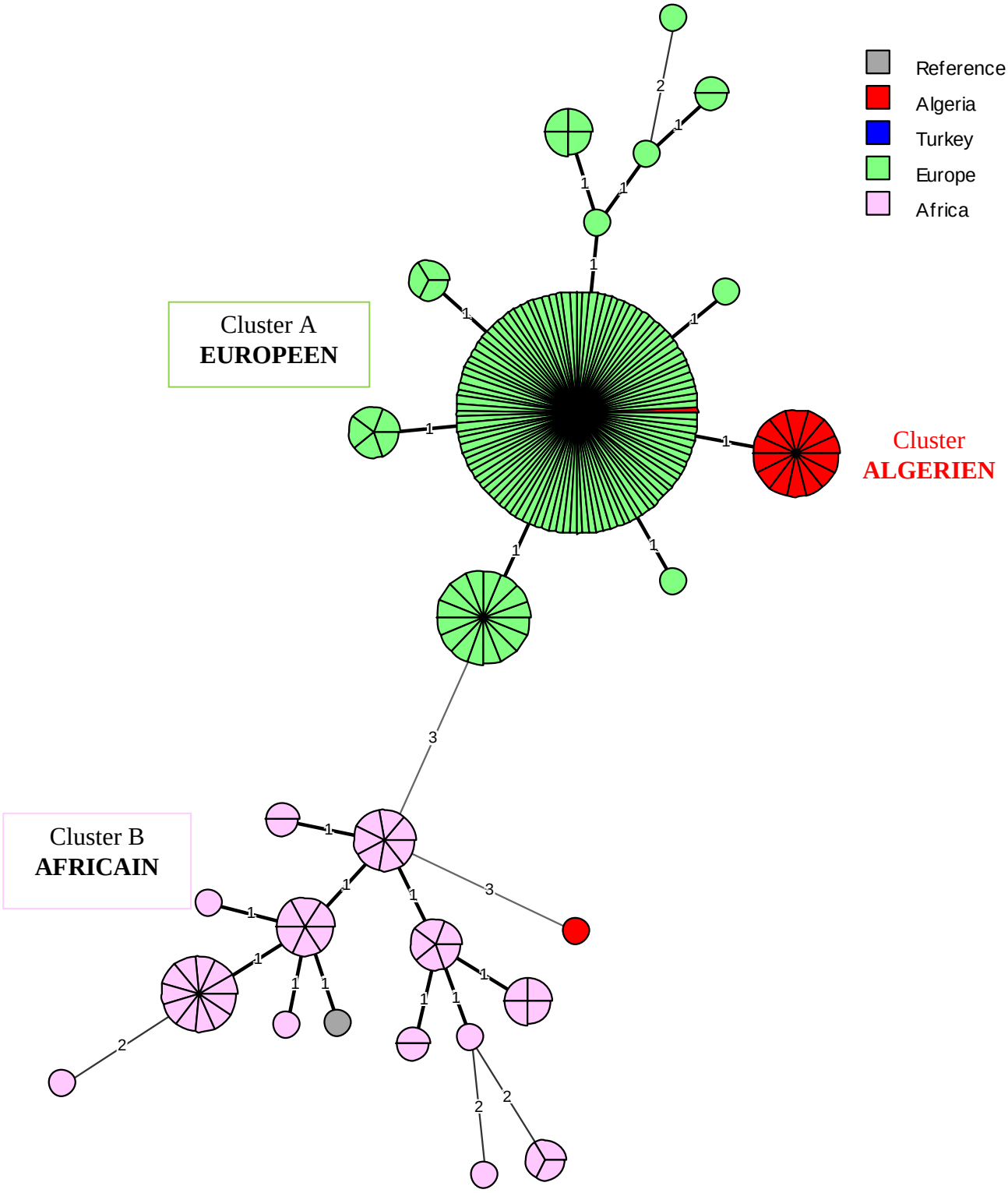


Figure 6.8 : MST des génotypes MLVA11 de 203 souches de *B. abortus* bv 3 d'Algérie, d'Europe* et d'Afrique** (excepté Algérie)

* France, Allemagne, Grèce, Italie, Espagne, Turquie.

** Kenya, Nigeria, Soudan.

3. Schéma MLVA-16

Les résultats MLVA-16 sont présentés dans les fig. 6.9 et 6.10. En utilisant tous les marqueurs MLVA-16 (marqueurs du panel 1 et 2), les 16 souches de *B. abortus* bv 3étudiées se caractérisent par 10 génotypes différents.

La souche de référence *B. melitensis* bv 1 16M est utilisée dans l'analyse des données dans le but d'enraciner le dendrogramme ; elle n'est donc pas prise en compte dans les résultats présentés en fig. 6.9.

Les souches étudiées sont réparties en deux clusters A et B qui regroupent l'ensemble des souches *B. abortus* bv 3 :

Le cluster A.1 regroupe toutes les souches *B. abortus* bv 3 d'origine africaine (à l'exception des souches algériennes de cette étude) et est ainsi désigné comme le **cluster africain**. Il regroupe toutes les souches *B. abortus* bv 3 africaines : Kenya, Nigeria, Soudan, ainsi que la souche de référence Tulya isolée en Uganda, dans le sous-cluster A.1.1. Le sous-cluster A.1.2 contient uniquement la souche *B. abortus* bv 3 humaine algérienne.

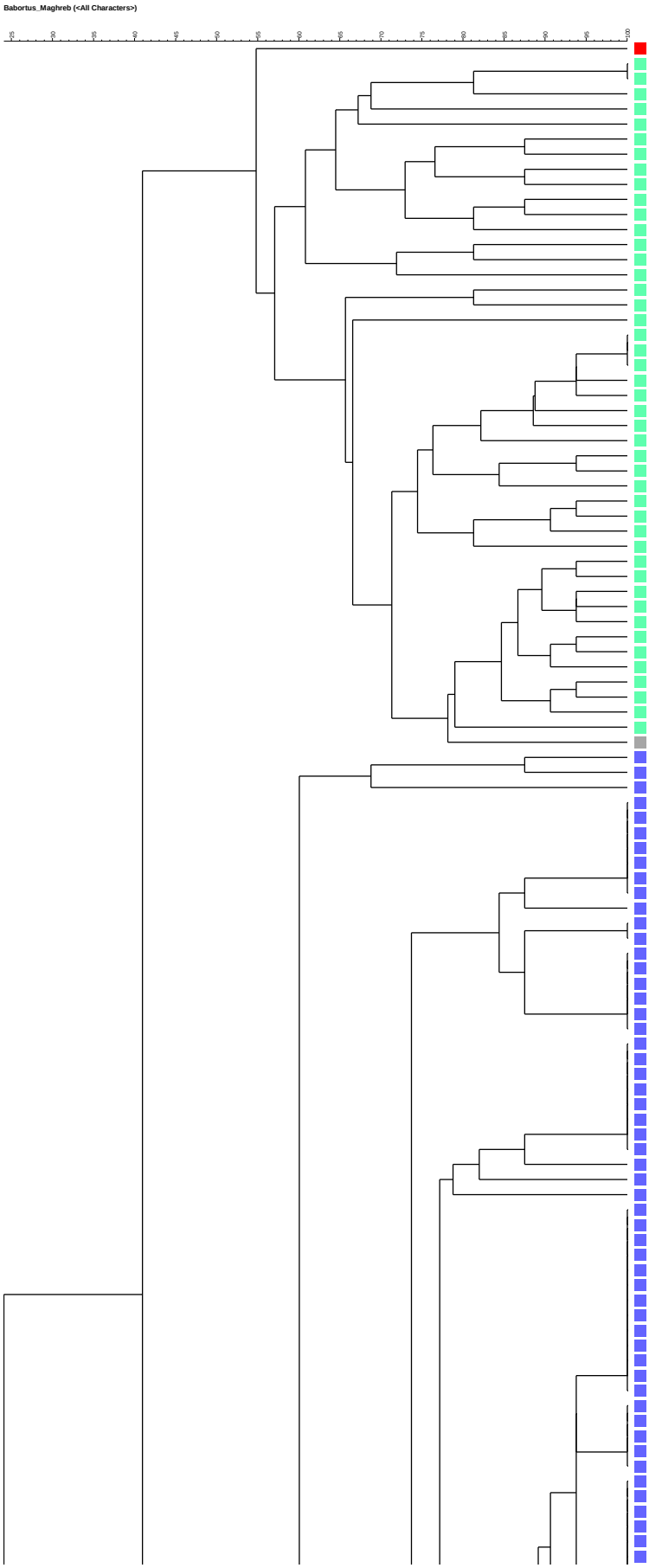
Il est surprenant de constater que cette souche humaine est génétiquement proche des souches africaines et se distingue ainsi des autres souches bovines algériennes. Ces résultats soulèvent ainsi des questions sur la source de contamination du patient. Il pourrait avoir contracté la brucellose lors d'un séjour en Afrique sub-saharienne plutôt que lors de son séjour en Algérie. Mais les données épidémiologiques actuelles ne permettent pas d'étayer cette hypothèse.

Le cluster A.2 quant à lui regroupe toutes les souches européennes de *B. abortus* bv 3 (France, Allemagne, Grèce, Italie, Espagne et Turquie), ainsi que toutes les souches algériennes bovines. Il est donc désigné **cluster algéro-européen.** De façon intéressante, il se subdivise en sous-cluster A.2.1 qui contient uniquement la souche de référence *B. abortus* bv 1 544 et le sous-cluster A.2.2 avec les souches européennes et algériennes.

Ces résultats illustrent la proximité des souches algériennes bovines avec les souches européennes, et particulièrement avec l'Italie, qui ne présente pas de liens économiques ou historiques notables avec l'Algérie.

Depuis les années 70 à nos jours, les importations des génisses pleines en Algérie, s'effectuent principalement à partir des pays européens (France, Allemagne, Autriche, Pays Bas)(Akakpo *et al.*, 2009). Or, des études ont montré que 10% des bovins importés étaient séropositifs (Benaissa et Benaouf, 1984).

Cette étude pilote génère les premiers résultats sur la caractérisation moléculaire des souches *B. abortus* bv 3 circulant en Algérie. Les résultats préliminaires obtenus montrent une proximité phylogéographique des souches algériennes et européennes, suggérant que l'origine de la brucellose bovine en Algérie pourrait être en lien avec l'importation d'animaux infectés à partir d'Europe. Des données supplémentaires sont donc nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.



Ba0004	03-1413	Human	Algeria		2003	Anses
Ba0028	A-610	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0029	A-611	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0031	A-613	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0039	A-632	Bovine	Nigeria	Adamawa		CITA
Ba0027	A-609	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0025	A-607	Sheep	Nigeria	Bauchi		CITA
Ba0026	A-608	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0022	A-604	Bovine	Nigeria	Plateau		CITA
Ba0030	A-612	Sheep	Nigeria	Bauchi		CITA
Ba0020	A-602	Bovine	Nigeria	Taraba		CITA
Ba0021	A-603	Bovine	Nigeria	Plateau		CITA
Ba0023	A-605	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0033	A-615	Bovine	Nigeria	Plateau		CITA
Ba0034	A-616	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0032	A-614	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0036	A-618	Horse	Nigeria	Plateau		CITA
Ba0038	A-620	Horse	Nigeria	Plateau		CITA
Ba0053	A-647	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0047	A-641	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0049	A-643	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0051	A-645	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0040	A-633	Bovine	Nigeria	Kaduna		CITA
Ba0048	A-642	Bovine	Nigeria	C/River		CITA
Ba0041	A-634	Bovine	Nigeria	Kaduna		CITA
Ba0052	A-646	Bovine	Nigeria	Plateau		CITA
Ba0045	A-638	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0035	A-617	Bovine	Nigeria	Plateau		CITA
Ba0037	A-619	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0050	A-644	Bovine	Nigeria	Benue		CITA
Ba0042	A-635	Bovine	Nigeria	Plateau		CITA
Ba0043	A-636	Bovine	Nigeria	Kaduna		CITA
Ba0044	A-637	Bovine	Nigeria	Kaduna		CITA
Ba0024	A-606	Bovine	Nigeria	Adamawa		CITA
Ba0099	10-KEBa1	Bovine	Kenya	Eastern	2009	Muendo2011
Ba0101	12-KEBa1	Bovine	Kenya	Central	2009	Muendo2011
Ba0095	6-KEBa1	Bovine	Kenya	Eastern	2009	Muendo2011
Ba0096	7-KEBa1	Bovine	Kenya	Eastern	2009	Muendo2011
Ba0102	13-KEBa1	Bovine	Kenya	Central	2009	Muendo2011
Ba0046	A-640	Bovine	Nigeria	C/River		CITA
Ba0097	8-KEBa1	Bovine	Kenya	Eastern	2009	Muendo2011
Ba0098	9-KEBa1	Bovine	Kenya	Eastern	2009	Muendo2011
Ba0100	11-KEBa2	Bovine	Kenya	Central	2009	Muendo2011
Ba0103	14-KEBa2	Bovine	Kenya	Central	2009	Muendo2011
Ba0104	15-KEBa2	Bovine	Kenya	Central	2009	Muendo2011
Ba0106	BCCN 93-26	Dromedary	Sudan		1993	Le Flèche2006
Ba0003	REF Tulya	Human	Uganda			Le Flèche2006
Ba0064	A-123	Bovine	Spain	Derio	1995	CITA
Ba0067	A-148	Bovine	Spain	Pamplona	1995	CITA
Ba0066	A-134	Bovine	Spain	Santander	1995	CITA
Ba0087	1368		Italy	Agnone,Italy	2011	Garofolo2013
Ba0088	1369		Italy	Pescopennataro,Italy	2011	Garofolo2013
Ba0089	15073		Italy	San Marco in Lamis,It.	2011	Garofolo2013
Ba0090	15076		Italy	San Marco in Lamis,It.	2011	Garofolo2013
Ba0091	1600		Italy	Agnone,Italy	2011	Garofolo2013
Ba0093	2078		Italy	Pescopennataro,Italy	2011	Garofolo2013
Ba0094	8982		Italy	San Marci in Lamis,It.	2011	Garofolo2013
Ba0092	20016		Italy	Apricena,Italy	2011	Garofolo2013
Ba0235	3272	Bovine	Italy	Apricena	2011	Garofolo2013
Ba0236	18081	Bovine	Italy	Apricena	2011	Garofolo2013
Ba0083	1046		Italy	Roccaspinalveti	2011	Garofolo2013
Ba0084	2705		Italy	Pescara	2011	Garofolo2013
Ba0085	3915		Italy	Pescopennataro	2011	Garofolo2013
Ba0086	1366		Italy	Vastogirardi,Italy	2011	Garofolo2013
Ba0232	1046	Bovine	Italy	Roccaspinalveti	2011	Garofolo2013
Ba0233	3915	Bovine	Italy	Pescopennataro	2011	Garofolo2013
Ba0224	12839	Bovine	Italy	Umbriatico	2011	Garofolo2013
Ba0225	17472	Bovine	Italy	Scala Coeli	2011	Garofolo2013
Ba0226	17476	Bovine	Italy	Umbriatico	2011	Garofolo2013
Ba0227	18936	Bovine	Italy	Casabona	2011	Garofolo2013
Ba0228	6047	Bovine	Italy	Scala Coeli	2011	Garofolo2013
Ba0229	6459	Bovine	Italy	Umbriatico	2011	Garofolo2013
Ba0230	9059	Bovine	Italy	Umbriatico	2011	Garofolo2013
Ba0231	9060	Bovine	Italy	Scala Coeli	2011	Garofolo2013
Ba0154	6060	Bovine	Italy	San Marco Argentano	2011	Garofolo2013
Ba0186	1567	Bovine	Italy	Agnone	2011	Garofolo2013
Ba0105	BRU-S 093	Human	Turkey	Trabzon	2006	Kilic2011
Ba0210	3636	Bovine	Italy	Monte San Giacomo	2011	Garofolo2013
Ba0211	3916	Bovine	Italy	Monte San Giacomo	2011	Garofolo2013
Ba0212	3920	Bovine	Italy	Teggiano	2011	Garofolo2013
Ba0213	4363	Bovine	Italy	Laurenzana	2011	Garofolo2013
Ba0214	12183	Bovine	Italy	Corleto Monforte	2011	Garofolo2013
Ba0215	12185	Bovine	Italy	San Rufo	2011	Garofolo2013
Ba0216	21571	Bovine	Italy	Monte San Giacomo	2011	Garofolo2013
Ba0217	21675	Bovine	Italy	Monte San Giacomo	2011	Garofolo2013
Ba0218	22839	Bufalo	Italy	Albanella	2011	Garofolo2013
Ba0219	22842	Bovine	Italy	Teggiano	2011	Garofolo2013
Ba0220	5362	Bufalo	Italy	Monte San Giacomo	2011	Garofolo2013
Ba0221	8980	Bovine	Italy	Teggiano	2011	Garofolo2013
Ba0222	8984	Bovine	Italy	Sassano	2011	Garofolo2013
Ba0205	3921	Bovine	Italy	San Gregorio Magno	2011	Garofolo2013
Ba0206	5007	Bovine	Italy	San Gregorio Magno	2011	Garofolo2013
Ba0207	6861	Bovine	Italy	Agropoli	2011	Garofolo2013
Ba0208	6863	Bovine	Italy	San Gregorio Magno	2011	Garofolo2013
Ba0209	8055	Bovine	Italy	Calvello	2011	Garofolo2013
Ba0196	3634	Bufalo	Italy	Capaccio	2011	Garofolo2013
Ba0197	2685	Bufalo	Italy	Eboli	2011	Garofolo2013
Ba0198	2686	Bovine	Italy	Campana	2011	Garofolo2013
Ba0199	12178	Bovine	Italy	Sala Consilina	2011	Garofolo2013
Ba0200	20825	Bovine	Italy	San Rufo	2011	Garofolo2013
Ba0201	2683	Bufalo	Italy	Capaccio	2011	Garofolo2013

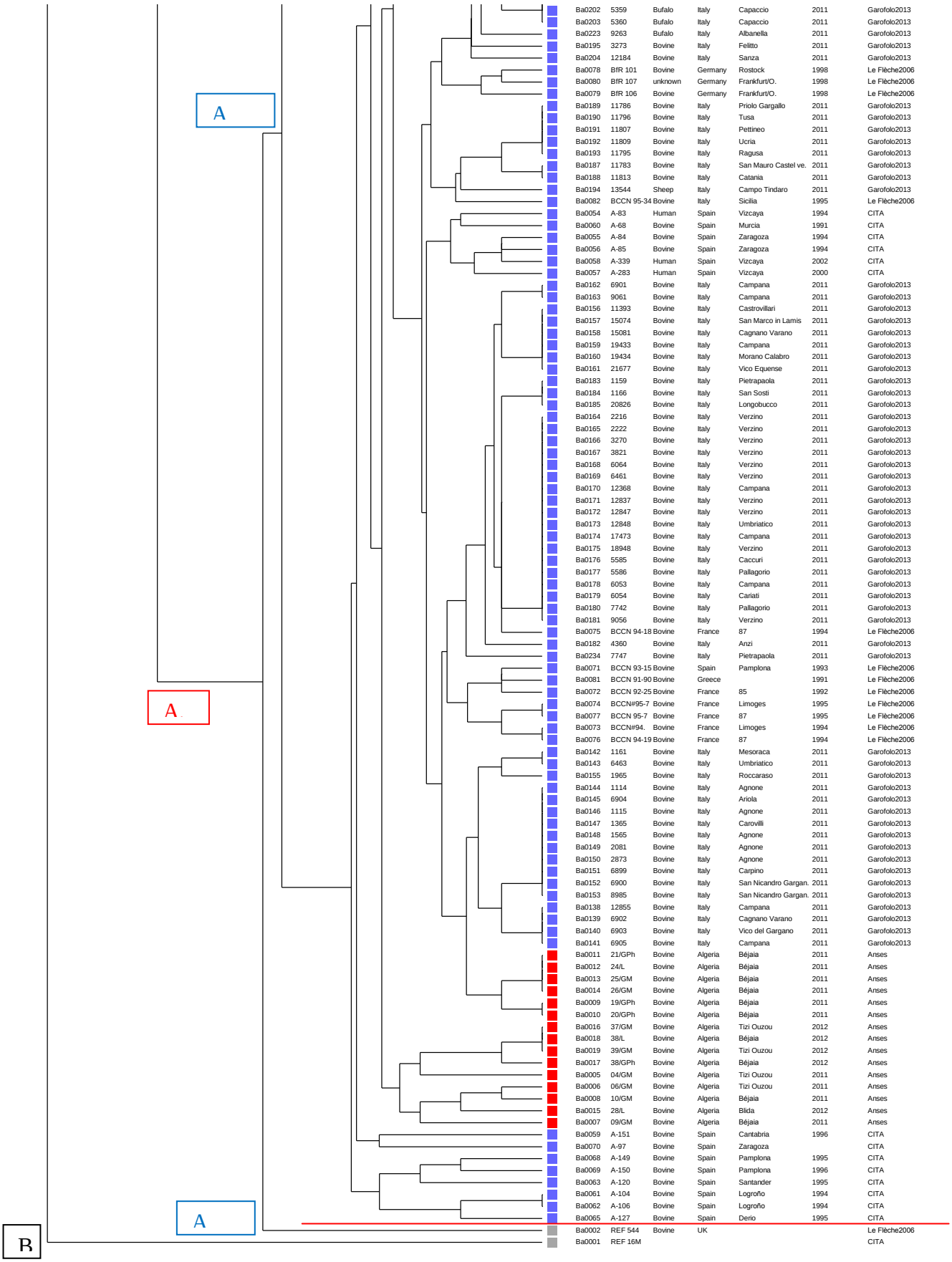


Figure 6.9 : Dendrogramme des génotypes MLVA16 de 205 souches *B. abortus* bv 3 (UPGMA, matrice de distance par catégorie)

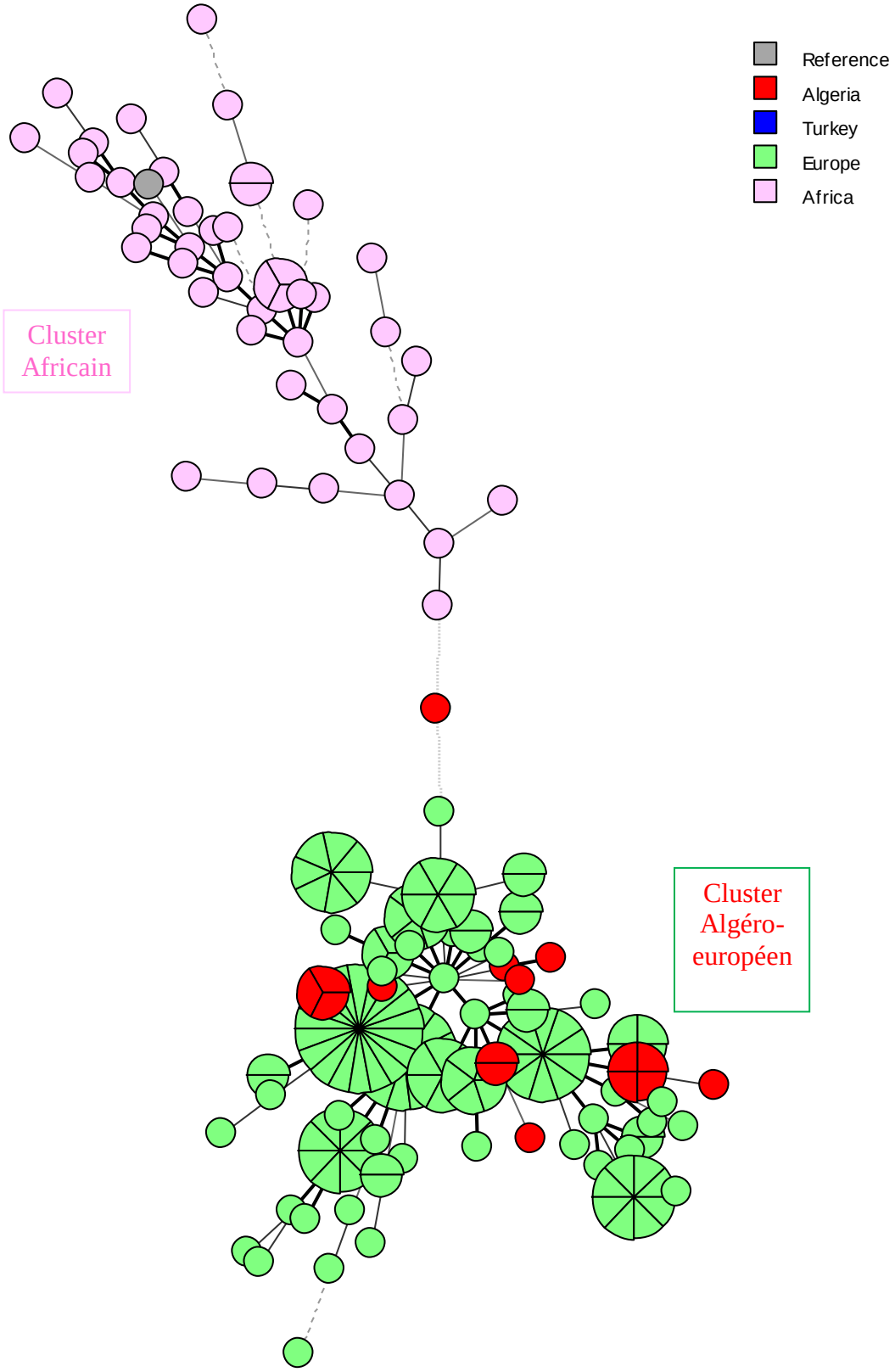


Figure 6.10 : MST des génotypes MLVA16 des 205 souches *B. abortus* (avec pondération des panels)

IV. CONCLUSION DE LA PARTIE II

Bien que le Maghreb soit une zone où la brucellose est endémique avec un réservoir animal important, la situation épidémiologique reste encore mal connue. L'incidence des brucelloses humaine et animale est encore sous-estimée et peu rapportée dans ces pays.

Notre étude donne un aperçu sur la situation épidémiologique de la brucellose au Maghreb et en Algérie en particulier. Notre travail décrit pour la première fois la caractérisation moléculaire des souches de *B. melitensis* et *B. abortus* circulant en Algérie.

La méthode de typage moléculaire MLVA-16 utilisée dans notre étude, fortement discriminante, permet le regroupement géographique des souches Maghrébines de *B. melitensis* bv 3 en deux lignées, suggérant l'existence d'un groupe autochtone Maghrébin et d'une lignée résultant des relations socio-historiques et économiques avec l'Europe. Cette même méthode nous a permis de montrer également une proximité phylogéographique des souches algériennes et européennes de *B. abortus* bv 3, suggérant que l'origine de la brucellose bovine en Algérie pourrait être en lien avec l'importation d'animaux infectés à partir d'Europe.

Conclusion générale

En Algérie, toutes les données épidémiologiques connues sur la brucellose, sont issues d'études sérologiques. La recherche bactériologique des *Brucella* dans les laboratoires de diagnostic est pratiquement inexistante. Très peu d'études rapportent l'isolement, l'identification et la distribution des souches de *Brucella* existantes en Algérie.
En effet, notre travail constitue la première étude, qui rapporte les différents biovars de *Brucella* existants chez les bovins en Algérie, et leur distribution à travers les quatre régions du pays.

Nous rapportons les premières données épidémiologiques qui font ressortir l'existence de *B. abortus* dans nos élevages bovins. En l'occurrence, *B. abortus* bv 3 constitue le biovar dominant. On retrouve aussi, *B. abortus* bv 2 et *B. melitensis* bv 2 qui sont isolées pour la première fois dans la région maghrébine. On constate que *B. melitensis* bv 2 est en majorité isolée à l'Ouest du pays. Trois quart des souches ont été isolées de la mamelle (lait ou ganglions mammaires), ce qui constitue un sérieux problème de santé publique, vu les habitudes alimentaires de la population, qui apprécie le lait cru de vache. Ce problème est encore plus grave, puisque nous avons détecté une antibiorésistance des souches de *B. abortus* bv 3 à la streptomycine, qui constitue l'un des traitements préconisés pour la brucellose humaine.

L'analyse par PCR-TR des prélèvements de ganglions a rapporté une sensibilité plus élevée par rapport à la bactériologie, ce qui semble intéressant puisque cette méthode est plus rapide, plus simple et ne présente pas de danger pour le manipulateur.

Nous avons également isolé *B. melitensis* bv 3, qui constitue le biovar quasi-exclusif chez les cas humains en Algérie et au Maghreb. L'étude moléculaire par génotypage MLVA-16, des souches animales et humaines de *B. melitensis* bv 3, issues des trois pays maghrébins (Algérie, Tunisie et Maroc), a révélé l'existence d'un cluster algéro-marocain, très proche du groupe européen, et un cluster algéro-tunisien, qui suggèrerait l'existence d'une lignée autochtone. Ces données épidémiologiques sur la phylogénie des souches maghrébines de *Brucella* constituent la première étude au Maghreb.

De même, notre étude génère les premiers résultats sur la caractérisation moléculaire des souches *B. abortus* bv 3 circulant en Algérie. Les résultats préliminaires obtenus montrent une proximité phylogéographique des souches algériennes et européennes, suggérant que l'origine de la brucellose bovine en Algérie pourrait être en lien avec l'importation d'animaux infectés à partir d'Europe.

Recommandations et perspectives

A l'issue de notre étude, nous confirmons que la connaissance des souches de *Brucella* circulantes dans nos élevages est indispensable tant sur le plan diagnostic, épidémiologique que prophylactique, il est donc recommandé de :

- Doter les laboratoires vétérinaires régionaux d'équipements et d'outils récents de diagnostic, leur permettant de procéder au typage des *Brucella* afin de contribuer à la traçabilité de l'origine des souches isolées.

- Créer un laboratoire de référence des *Brucella* avec les équipements qui permettent des recherches phénotypiques et moléculaires.

Aussi, à la lumière de nos résultats, il serait intéressant d'explorer de nouvelles pistes de recherche afin de :

- Compléter les résultats de notre étude phénotypique dans les autres wilayas non étudiées; ce qui pourrait contribuer à trouver d'autres biovars, pouvant exister dans nos élevages.

- Elargir à d'autres espèces animales domestiques (petits ruminants, camelins et canins), afin de compléter les données épidémiologiques sur les différentes espèces et biovars de *Brucella* existantes en Algérie.

- Confirmer les résultats préliminaires obtenus de la caractérisation moléculaire des souches *B. abortus* circulant en Algérie.

- Parfaire notre étude par l'identification des souches de *Brucella* responsables des cas humains, afin d'estimer la proportion des cas dus à *B. abortus*.

- Etudier le profil génétique des souches antibiorésistantes retrouvées dans notre étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AARN (2011). Standartisation de l'antibiogramme à l'échelle Nationale (Médecine humaine et vétérinaire), Réseau Algérien de Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Acha, P. N., and Szyfres, B. (1989). Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, OIE.

Acha, P. N., and Szyfres, B. (2005). Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux (Troisième édition) (OIE, ed.), Vol. Vol. I. Bacterioses et Mycoses, pp. 26-52.

AFNOR (Avril 2004). NF U 47-105 - Méthodes d'analyse en santé animale - Isolement et identification de Brucella spp. autres que B. ovis et B. canis. pp. 21p. .

Aggad, H., and Boukraa, L. (2006). Prevalence of bovine and human brucellosis in western Algeria: comparison of screening tests. *Eastern Mediterranean Health Journal* **12**, 119.

Akakpo, A., Têko-Agbo, A., and Koné, P. (2009). L'impact de la brucellose sur l'économie et la santé publique en Afrique. *In* "Conf. OIE", pp. 71-84.

Akakpo, J. A., and Ndour, A. P. N. (2013). La brucellose bovine en Afrique de l'ouest et du centre : état des lieux. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales* **Vol.11**, 23-28.

Al Dahouk, S., Flèche, P. L., Nöckler, K., Jacques, I., Grayon, M., Scholz, H. C., Tomaso, H., Vergnaud, G., and Neubauer, H. (2007). Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis. *Journal of Microbiological Methods* **69**, 137-145.

Alton, G., Jones, L., Angus, R., and Verger, J., eds. (1988). "Techniques for the Brucellosis Laboratory," pp. 1-190p. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

Álvarez, J., Sáez, J. L., García, N., Serrat, C., Pérez-Sancho, M., González, S., Ortega, M. J., Gou, J., Carbajo, L., and Garrido, F. (2011). Management of an outbreak of brucellosis due to B. melitensis in dairy cattle in Spain. *Research in Veterinary Science* **90**, 208-211.

Amin, A. S., Hamdy, M. E. R., and Ibrahim, A. K. (2001). Detection of Brucella melitensis in semen using the polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology* **83**, 37-44.

Anonyme (1998). "Situations et stratégies de lutte contre les brucelloses bovine, ovine et caprine au Maroc." Ministère de l'Agriculture, Terre et Vie http://marocagri.multimania.com.

Aznar, M. N., Samartino, L. E., Humblet, M. F., and Saegerman, C. (2014). Bovine Brucellosis in Argentina and Bordering Countries: Update. *Transboundary and Emerging Diseases* **61**, 121-133.

Banai, M., and Corbel, M. (2010). Taxonomy of Brucella. *Open Veterinary Science Journal* **4**, 85-101.

Bankole, A. A., Saegerman, C., Berkvens, D., Fretin, D., Geerts, S., Ieven, G., and Walravens, K. (2010). Phenotypic and genotypic characterisation of Brucella strains isolated from cattle in the Gambia. *Veterinary Record* **166**, 753-756.

Baumgarten, D. (2002). Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Veterinary Microbiology* **90**, 63-69.

Bekkali, A. (1981). Contribution à l'étude épidémiologique de la brucellose bovine dans la région de Rabat, Institut agronomique et vétérinaire Hassan II.

Belahcen, A., Benkaddour, K., Hassani, S., Chami-Khazraji, Y., Arrach, M. L., and Mahjour, J. (2002). Séroprévalence de la brucellose humaine en milieu rural au Maroc, 1999. *D.E.L.M. Bulletin Epidémiologique 1er trimestre 2002,* **N°49**, pp 3-9.

Belkhayat, A. (1976). Enquête sur la brucellose bovine au Maroc. *In* "International Symposium on Brucellosis" (S. B. Karger, ed.), Vol. 31, pp. 268-273 Develop. Biol. Standard Rabat 1975.

Ben Malek, S. (2012). Contribution à l'étude épidémiologique de la brucellose chez les petits ruminants et l'homme dans le gouvernorat de Bizerte, Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet.

Benaissa, A., and Benaouf, H. (1984). Prophylaxie de la brucellose bovine dans les unités d'élevage du secteur socialiste de la wilaya de Annaba de 1976 à 1982, plan de lutte, résultats et recommandations. (B. S. Karger, ed.), Vol. 56, pp. 727-735. Develop. biol. Standard.

Benaouf, H., Sfaksi, A., Sayah, N., Azzouz, R., and Grabssia, M. (1990). Situation et évolution de la brucellose dans l'est algérien de 1976 à 1990, enquête épidémiologique et programme de lutte. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Benbernou, A., Ouadahi, F., Kassab, A., and Bouzouidja, F. (2004). Enquête brucellose chez les petits ruminants. *In* "Atelier maladies abortives des petits ruminants ", Alger 28 juin 2004.

Benchouk, S. (1990). Étude épidémiologique de la brucellose humaine dans la wilaya de Tlemcen. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Benelmouffok, A. (1970). Aperçu sur la situation actuelle de la brucellose bovine en Algérie. *Arch. Inst. Pasteur. Algérie* **T 48**, 207-209.

Benelmouffok, A. (1978-1979). La brucellose bovine en Algérie: Bilan du dépistage sérologique de 1969 à 1976. *Arch. Inst. Pasteur Algérie* **T 53** 120-126.

Benelmouffok, A., Cherif, A., and Taril, A. (1984). La brucellose bovine en Algérie: dépistage sérologique de 1969 à 1982 et analyse des résultats. (B. Karger, ed.), Vol. 56, pp. 699-709. Develop. biol. Standard. .

Benhabyles, N. (1992a). La brucellose en Algérie: situation épidémiologique. *R.E.M. INSP* **N°3.**

Benhabyles, N. (1992b). La brucellose: données fondamentales. *Relevé Epidémiologique Mensuel INSP*, **vol III N°2**.

Benhabyles, N. (1999). Épidémiologie des brucelloses en Algérie. *In* "Séminaire brucelloses", Constantine 23-24 juin 1999.

Benhabyles, N., Benkirane, A., Boudilmi, B., Benchouk, S., and Bouayoun, H. (1992). Epidemiology of human and animal brucellosis in Maghreb. *In* "Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries" (M. Plommet, ed.), Vol. 1, pp. 36-51. Pudoc, Wageningen.

Benhabyles, N., Hannoun, D., and Atek, M. (1990). Situation épidémiologique nationale de la brucellose humaine. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990

Benkirane, A. (2006). Ovine and caprine brucellosis: World distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. *Small Ruminant Research* **62**, 19-25.

Benkirane, A., Jabli, N., and Rodolakis, A. (1990). Fréquence d'avortement et séroprévalence des principales maladies infectieuses abortives ovines dans la région de Rabat (Maroc). *In* "Annales de Recherches Vétérinaires", Vol. 21, pp. 267-273.

Benslimani, A., Benamrouche, N., Hamoudi, N., Lazri, M., Senouci, H., Ouar, M., Tali-Maamar, H., Khemissi, A., Bougherbal, R., Ammar Amrane, M., Kezzal, K., and Rahal, K. (2011/2012). Brucella melitensis de sensibilité diminuée à la rifampicine et présentant un polymorphisme smooth/rough en primoculture : à propos d'un cas d'endocardite brucellienne sur valve native. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie* **T.68**, 7-22.

Benslimani, A., Fenollar, F., Lepidi, H., and Raoult, D. (2005). Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. *Emerging infectious diseases* **11**, 216.

Benzarti, M., Mansouri, R., Heddia, L., and Bennasser, A. (2009). Estimation de la prévelence de la brucellose caprine dans le sud tunisien. *In* "1ère Journées Maghrébines d'Epidémiologie Animale", Tipaza 09 & 10 mai 2009.

Benzarti, M., Ouertani, I., Ben Malek, S., Rebai, Y., Chokri, A., and Bouzghaia, H. (2011). Point sur la Brucellose en Tunisie. *In* "4èmes JVB" (R. d. j. v. d. Blida, ed.), Université Saad Dahleb- Blida, 28-29 novembre 2011.

Berrada, J., Kichou, F., and Naimi, M. H. (2004). Avortements et séroprévalence de la chlamydiose et de la brucellose chez les caprins dans les provinces de Chefchaouène et Tétouan (Maroc). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* **24**, 85-90.

Bertu, W. J., Ducrotoy, M. J., Muñoz, P. M., Mick, V., Zúñiga-Ripa, A., Bryssinckx, W., Kwaga, J. K. P., Kabir, J., Welburn, S. C., Moriyón, I., and Ocholi, R. A. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of Brucella strains isolated from autochthonous livestock reveals the dominance of B. abortus biovar 3a in Nigeria. *Veterinary Microbiology* **180**, 103-108.

Blasco, J. M. (1992). Diagnosis of Brucella melitensis infection in small ruminants. *In* "Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries" (M. Plommet, ed.), pp. 272-278. Pudoc Scientofic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Boudilmi, B., Chalabi, N., and Mouaziz, A. (1990). Brucellose animale et humaine dans l'ouest algérien. Quelques résultats bactériologiques et sérologiques. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa14 et 15 novembre 1990.

Boukary, A. R., Saegerman, C., Adehossi, E., Matthys, F., Vias, G. F., Yenikoye, A., and Thys, E. (2014). Brucellosis in sub-Saharan Africa. *Annales de Medecine Veterinaire* **158**, 283-289.

Boukerrou, A. (1990). Résultats préliminaires d'une enquête séro-épidémiologique sur la brucellose bovine en 1988. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Bounaadja, L. (2010). Développement d'une PCR en temps réel pour la détection des Brucella et relations avec le genre Ochrobactrum, Université de Maine

Bounaadja, L., Albert, D., Chénais, B., Hénault, S., Zygmunt, M. S., Poliak, S., and Garin-Bastuji, B. (2009). Real-time PCR for identification of Brucella spp.: A comparative study of

IS711, bcsp31 and per target genes. *Veterinary Microbiology* **137**, 156-164.

Bricker, B. J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* **90**, 435-446.

Bulletin Epidémiologique, D. E. L. M. (2002). "Bilan année 2002." Ministère de la santé. Royaume du Maroc. .

Bulletin Epidémiologique, D. E. L. M. (2003). "Bilan année 2003." Ministère de la santé. Royaume du Maroc.

Bulletin Epidémiologique, D. E. L. M. (2007). "Bilan année 2005." Ministère de la santé. Royaume du Maroc. .

Bulletin Epidémiologique, D. E. L. M. (2008). "Bilan année 2006." Ministère de la santé. Royaume du Maroc. .

Bulletin Info Elevage (2013). Dynamiques de developpement de la filiere lait en algerie. N°6, 4p. ITELV, Ministère de l'agriculture et du développent rural, www.minagri.dz/pdf/BMI/ITELV/Bulletin_Infos_Elevage_n06.pdf.

Calvez, D., Thiebaud, M., and Garin-Bastuji, B. (2001). Evidence of genomic heterogeneity within the biovar 3 of Brucella melitensis by PFGE. *In* "International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology", Salsomaggiore – Parma, Italy, 4–7 july 2001.

Chaabani, M. F. (1995). Contribution à l'étude de l'épidémiologie des brucelloses humaine et animales en Tunisie : Etude rétrospective sur la période allant de 1989 à 1993, Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet.

Chakroun, M., and Bouzouaia, N. (2007). La brucellose: une zoonose toujours d'actualite. *Rev Tun Infectiol* **Vol 1**, 1 - 10

Cherif, A., Benelmouffok, A., and Doudou, A. (1986). Consommation de fromage de chèvre et brucellose humaine à Ghardaïa (Algérie). *Arch. Inst. Pasteur. Algérie* **T 55**, 9-14.

Cherif, R. (1990). Les brucelloses animales à Ghardaïa. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Cloeckaert, A., Grayon, M., and Grepinet, O. (2000). An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of Brucella spp. isolated from marine mammals. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**, 835 - 839.

Cloeckaert, A., Grayon, M., Grepinet, O., and Boumedine, K. (2003). Classification of Brucella strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect* **5**, 593 - 602.

Cloeckaert, A., Verger, J., Grayon, M., and Vizcaino, N. (1996). Molecular and immunological characterisation of the major outer membrane proteins of Brucella. *FEMS Microbiol Lett* **145**, 1 - 8.

Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose (1986). "sixième rapport." OMS, Genève.

Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerging infectious diseases* **3**, 213.

D.S.V. (2002). Bulletin sanitaire vétérinaire. Ministère de l'agriculture et du développement rural. pp. 4-5

D.S.V. (2005). Programmes de lutte contre les zoonoses initiés par le ministère de l'agriculture et du développement rural. Direction des services vétérinaires

D.S.V. (2007). Bulletin sanitaire vétérinaire, Ministère de l'agriculture et du développement rural.

D.S.V. (2010). Bulletin sanitaire vétérinaire, Ministère de l'agriculture et du développement rural.

D.S.V. (2011). Programmes de lutte contre les zoonoses. . Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.

D.S.V. (2014). Bulletin sanitaire vétérinaire, Ministère de l'agriculture et du développement rural.

De Massis, F., Zilli, K., Ancora, M., Di Donato, G., Scacchi, M., and Di Giannatale, E. (2014). Update about typing of Brucella field strains isolated from livestock and wildlife population in Italy, 2007-2012. *In* "Brucellosis 2014 International Research Conference ", Berlin, 9-12 september 2014.

Debeaumont, C., Falconnet, P. A., and Maurin, M. (2005). Real-time PCR for detection of Brucella spp. DNA in human serum samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **24**, 842-845.

DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G., and Mujer, C. V. (2002). The genome of Brucella melitensis. *Veterinary Microbiology* **90**, 587-592.

Denisov, A. A., Sclyarov, O. D., Salmakov, K. M., and Shumilov, K. V. (2013). The Russian experience in brucellosis veterinary public health. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **32**, 229-237.

Deqiu, S., Donglou, X., and Jiming, Y. (2002). Epidemiology and control of brucellosis in China. *Veterinary Microbiology* **90**, 165-182.

Díaz Aparicio, E. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by Brucella melitensis, Brucella suis and Brucella abortus. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **32**, 43.

Ducrotoy, M., Ammary, K., Ait Lbacha, H., Zouagui, Z., Mick, V., Prevost, L., Bryssinckx, W., Welburn, S., and Benkirane, A. (2015). Narrative overview of animal and human brucellosis in Morocco: intensification of livestock production as a driver for emergence? *Infectious Diseases of Poverty* **4**, 57.

El Hraiki, A. (1984). Contribution à la prophylaxie de la brucellose bovine: Suites bactériologiques et sérologiques de la vaccination au B19 à dose réduite dans un troupeau., Institut agronomique et vétérinaire Hassan II.

El Idrissi, A. H. (1996). "Brucellose des petits ruminants : enquête épidémiologique dans l'Oriental.." Ministère de l'Agriculture et de la Mise en Valeur Agricole.

El Idrissi Hamzy, A., Manyari, A., and Benkirane, A. (1995). Fréquence des avortements infectieux des ovins au Maroc (régions des Zaer et du Moyen Atlas). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* **15**, 11-14.

El Jai, S., Bouslikhane, M., and El Idrissi, A. H. (2003). Suivi épidémiologique des avortements de petits ruminants dans les zones pastorales du Maroc. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* **23**, 95-100.

European Food Safety Authority, E. C. f. D. P. a. C. (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* **12(2):3547**, 312 pp.

Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I., and Cloeckaert, A. (2007). Brucella ceti sp. nov. and Brucella pinnipedialis sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2688-2693.

Foster, J. T., Okinaka, R. T., Svensson, R., Shaw, K., De, B. K., Robison, R. A., Probert, W. S., Kenefic, L. J., Brown, W. D., and Keim, P. (2008). Real-time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms defining the major Brucella clades. *J Clin Microbiol* **46**, 296-301.

Francisco J., V. O. (2002). Brucellosis in Venezuela. *Veterinary Microbiology* **90**, 39-44.

Fretin, D., Whatmore, A. M., Al Dahouk, S., Neubauer, H., Garin-Bastuji, B., Albert, D., Van Hessche, M., Ménart, M., Godfroid, J., Walravens, K., and Wattiau, P. (2008). Brucella suis identification and biovar typing by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* **131**, 376-385.

Ganiere, J. P. (2004). La Brucellose Animale. *In* "polycopié des écoles nationales vétérinaires françaises", pp. 45 p.

Garcia-Yoldi, D., Le Fleche, P., De Miguel, M., Munoz, P., Blasco, J., Cvetnic, Z., Marin, C., Vergnaud, G., and Lopez-Goni, I. (2007). Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing Brucella suis isolates. *J Clin Microbiol* **45**, 4070 - 4072.

García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Vizmanos, J. L., and López-Goñi, I. (2006). Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all Brucella Species and the Vaccine Strains Brucella abortus S19 and RB51 and Brucella melitensis Rev1. *Clinical Chemistry* **52**, 779-781.

Garin-Bastuji, B. (1993). Brucelloses bovine, ovine et caprine : contrôle et prévention. *Le Point Vétérinaire* **vol. 25, n° 152**, 107-114.

Garin-Bastuji, B. (2004). Brucellose ovine et caprine, Épidémiologie - Diagnostic – Prophylaxie-Programmes de lutte et situation en Europe. *In* "Atelier maladies abortives des petits ruminants", ALGER.

Garin-Bastuji, B. (2012). Diagnostic/dépistage de la Brucellose ovine & caprine : Outils éprouvés et nouveaux outils. *In* "Réunion de travail du comité des partenaires et des stagiaires Projet AUF « Avortements infectieux chez les ruminants »", Sidi Thabet, le 20-21 septembre 2012 , Tunisie.

Garin-Bastuji, B., and Delcueillerie, F. (2001). Les brucelloses humaine et animale en France en l'an 2000. Situation épidémiologique—programmes de contrôle et d'éradication. *Médecine et Maladies Infectieuses* **31**, 202-216.

Garin-Bastuji B., and Trap D. (1990). "Brucelloses animales. Techniques de laboratoire," CNEVA Editions, Maisons-Alfort.

Garofolo, G., Ancora, M., and Di Giannatale, E. (2013). MLVA-16 loci panel on Brucella spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* **92**, 103-107.

Garofolo, G., Di Giannatale, E., De Massis, F., Zilli, K., Ancora, M., Cammà, C., Calistri, P., and Foster, J. T. (2013). Investigating genetic diversity of Brucella abortus and Brucella melitensis in Italy with MLVA-16. *Infection, Genetics and Evolution* **19**, 59-70.

Garrity, G. M., Bell, J. A., and Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Springer, New York, Berlin, Heidelberg*.

GDS (2003). Brucellose bovine. *Informations sanitaire, www.gds46.asso.fr/HTML/Infos_sanitaires/Brucellose/brucellose.pdf.*

Gharbi, M., Rejeb, A., Bejaoui, M., and Jemli, A. (2001). Note d'information-Cout de la brucellose humaine en Tunisie: etude sur 10 ans (de 1989 a 1998). *Journal d'Economie Medicale* **19**, 230.

Godfroid, F., Cloeckaert, A., Taminiau, B., Danese, I., Tibor, A., de Bolle, X., Mertens, P., and Letesson, J.-J. (2000). Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of Brucella melitensis 16M (wbk). *Research in Microbiology* **151**, 655-668.

Godfroid, J., Al-Mariri, A., Walravens, K., and Letesson, J. J. (2003). Brucellose bovine *In* "Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes" (P. C. Lefèvre, J. Blancou and R. Chermettre, eds.), Vol. maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires pp. 867-868. Edition Lavoisier, , Paris, London, New York. .

Godfroid, J., and Käsbohrer, A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary Microbiology* **90**, 135-145.

Godfroid, J., Nielsen, K., and Saegerman, C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal* **51**, 296-305.

Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A. M., Cloeckaert, A., Blasco, J. M., Moriyon, I., Saegerman, C., Muma, J. B., Al Dahouk, S., Neubauer, H., and Letesson, J. J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine* **102**, 118-131.

Gopaul, K. K., Koylass, M. S., Smith, C. J., and Whatmore, A. M. (2008). Rapid identification of Brucella isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiology* **8**, 86-86.

Gopaul, K. K., Sells, J., Bricker, B. J., Crasta, O. R., and Whatmore, A. M. (2010). Rapid and Reliable Single Nucleotide Polymorphism-Based Differentiation of Brucella Live Vaccine Strains from Field Strains. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 1461-1464.

Gupta, V. K., Verma, D. K., Singh, K., Kumari, R., Singh, S. V., and Vihan, V. S. (2006). Single-step PCR for detection of Brucella melitensis from tissue and blood of goats. *Small Ruminant Research* **66**, 169-174.

Gwida, M., Al Dahouk, S., Melzer, F., Rösler, U., Neubauer, H., and Tomaso, H. (2010). Brucellosis – Regionally Emerging Zoonotic Disease? *Croatian Medical Journal* **51**, 289-295.

Gwida, M. M., El-Gohary, A. H., Melzer, F., Tomaso, H., Rösler, U., Wernery, U., Wernery, R., Elschner, M. C., Khan, I., Eickhoff, M., Schöner, D., and Neubauer, H. (2011). Comparison of diagnostic tests for the detection of Brucella spp. in camel sera. *BMC Research*

Notes **4**, 525-525.

Halling, S., Tatum, F., and Bricker, B. (1993). Sequence and characterisation of an insertion sequence, IS711, from Brucella ovis. *Gene* **133**, 123 - 127.

Halling, S. M., and Zehr, E. S. (1990). Polymorphism in Brucella spp. due to highly repeated DNA. *Journal of Bacteriology* **172**, 6637-6640.

Halling, S. M., and Zuerner, R. L. (2002). Evidence for lateral transfer to Brucellae: characterization of a locus with a Tn-like element (Tn2020)1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1574**, 109-116.

Hamdi-Cherif, M., Ait-Hamouda, R., Touabti, A., Sedjal, R., , Khalfi, A., and Mechakra, S. (1990). La brucellose dans la wilaya de Sétif années 1987-1989 données épidémiologique et stratégie. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Hamdy, M. E. R., and Amin, A. S. (2002). Detection of Brucella Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *The Veterinary Journal* **163**, 299-305.

Hamza-Cherif, B. (1984,). La brucellose bovine au niveau de la wilaya de Tlemcen. *Maghreb vétérinaire* **vol.1, n° 4**, 45-47.

Hinić, V., Brodard, I., Thomann, A., Cvetnić, Ž., Makaya, P. V., Frey, J., and Abril, C. (2008). Novel identification and differentiation of Brucella melitensis, B. abortus, B. suis, B. ovis, B. canis, and B. neotomae suitable for both conventional and real-time PCR systems. *Journal of Microbiological Methods* **75**, 375-378.

Hoover, D. (2004). Brucellosis. *In* "Physician's Guide to Terrorist Attack" (M. Roy, ed.), pp. 111-121. Humana Press.

Huber, B., Scholz, H. C., Lucero, N., and Busse, H.-J. (2009). Development of a PCR assay for typing and subtyping of Brucella species. *International Journal of Medical Microbiology* **299**, 563-573.

Ilhan, Z., Aksakal, A., Ekin, I. H., Gülhan, T., Solmaz, H., and Erdenlig, S. (2008). Comparison of culture and PCR for the detection of Brucella melitensis in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Letters in Applied Microbiology*, **46**, 301-306.

Ilhan, Z., Solmaz, H., Aksakal, A., Gulhan, T., Ekin, I., and Boynukara, B. (2008). Detection of Brucella melitensis DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay. *Archivos de medicina veterinaria,* **40**, 141-146.

INSP (2011). Situation épidémiologique des zoonoses. Institut National de Santé Publique.

ISP, and WIV (2014). "Brucellose." Institut Scientifique de santé publique, https://www.wiv-isp.be

Kattar, M. M., Zalloua, P. A., Araj, G. F., Samaha-Kfoury, J., Shbaklo, H., Kanj, S. S., Khalife, S., and Deeb, M. (2007). Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **59**, 23-32.

Khan, M. Y., Mah, M. W., and Memish, Z. A. (2001). Brucellosis in Pregnant Women. *Clinical Infectious Diseases* **32**, 1172-1177.

Kılıc S., Ivanov I. N., Durmaz R., Bayraktar M. R., Ayaslioglu E., Uyanık M. H., Alıskan H., Yasar E., Bayramoglu G., Arslanturk A., Vergnaud G., and Kantardjiev T. V. (2011). Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Genotyping of Human Brucella Isolates from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 49**, 3276–3283.

Klouche, C. (1990). brucellose humaine à Ghardaïa. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa14 et 15 novembre 1990.

Korichi, M. N., and Rahal, K. (1995). Épidémie de la brucellose dans la wilaya d'El Oued (Algérie). *Arch. Inst. Pasteur. Algérie* **T 60**, 99-107.

Korichi-Ouar, M. N., Senouci, H., and Rahal, K. (2005). "Diagnostic Bactériologique et Sérologique de la Brucellose Humaine," ANDS, Institut Pasteur d'Algérie.

Kunkel, D. Brucella abortus. Inc. Science Stock Photography, Dennis Kunkel Microscopy, http://www.denniskunkel.com.

Kunkel, D. Brucella melitensis. Inc. Science Stock Photography, Dennis Kunkel Microscopy, http://www.denniskunkel.com.

Kurdoglu, M., Adali, E., Kurdoglu, Z., Karahocagil, M., Kolusari, A., Yildizhan, R., Kucukaydin, Z., Sahin, H., Kamaci, M., and Akdeniz, H. (2010). Brucellosis in pregnancy: a 6-year clinical analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **281**, 201-206.

Lahmar, A. (2013). L'infection brucellique caprine et humaine en Tunisie : Synthèse des enquêtes épidémiologiques descriptives réalisées à l'ENMV et estimation de son impact économique, Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet.

Lavigne, J.-P., and O'Callaghan, D. (2007). Brucella. *In* "Bactériologie Médicale" (François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christian Martin, Edouard Bingen and R. Quentin, eds.), pp. 372-380. . Elsevier Masson

Lavigne, J.-P., and O'Callaghan, D. (2011). Brucella. *In* "Bactériologie Médicale " (François Denis, Edouard Bingen, Christian Martin, Marie-Cécile Ploy and R. Quentin, eds.), pp. 413-421. Elsevier Masson.

Le Fleche, P., Jaques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., Nockler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L., and Vergnaud, G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. *BMC Microbiol* **6**, 9.

Leal-Klevezas, D. S., Martínez-Vázquez, I. O., López-Merino, A., and Martínez-Soriano, J. P. (1995). Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 3087-90.

Leyla, G., Kadri, G., and Ümran, O. (2003). Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Veterinary Microbiology*, **93**, 53-61.

López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Albert, D., and Garin-Bastuji, B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of Brucella suis and the discrimination of Brucella suis and Brucella canis. *Veterinary Microbiology*, **154**, 152-155.

López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Blasco, J. M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckaert, A., Ferreira, A. C., Cardoso, R., Corrêa de Sá, M. I., Walravens, K., Albert, D., and Garin-Bastuji, B. (2008). Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All Brucella Species, Including the Vaccine Strains.

Journal of Clinical Microbiology, **46**, 3484-3487.

Lounes, N. (2007). Séroprévalence de la brucellose animale dans la région centre et impact sur la santé publique, Université de Blida, Blida

Lounes, N. and Bouyoucef, A. (2009). Dépistage de la brucellose bovine dans la région centre durant dix ans de lutte (1995-2004). *Recueil des ateliers d'Epidémiologie Animale* **vol. 1**, pp 60-64.

Lounes, N., Cherfa, M.-A., Le Carrou, G., Bouyoucef, A., Jay, M., Garin-Bastuji, B., and Mick, V. (2014). Human Brucellosis in Maghreb: Existence of a Lineage Related to Socio-Historical Connections with Europe. *PLoS ONE,* **9**, e115319.

Luna-Martínez, J. E., and Mejía-Terán, C. (2002). Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Veterinary Microbiology* **90**, 19-30.

Madkour, M. M. (2001). Brucellosis: Overview. *In* "Madkour's Brucellosis", pp. 1-14. Springer Berlin Heidelberg.

Manninger, R., and Mocsy, J. (1959). "Traité des maladies internes des animaux domestiques Tome I. Maladies infectieuses," vigot frères éditeurs, Paris VI.

Manterola, L., Tejero-Garcés, A., Ficapal, A., Shopayeva, G., Blasco, J. M., Marin, C. M., and López-Goñi, I. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of Brucella ovis infection in semen samples from rams. *Veterinary Microbiology* **92**, 65-72.

Maquart, M., Le Fleche, P., Foster, G., Tryland, M., Ramisse, F., Djonne, B., Al Dahouk, S., Jacques, I., Neubauer, H., Walravens, K., Godfroid, J., Cloeckaert, A., and Vergnaud, G. (2009). MLVA-16 typing of 295 marine mammal Brucella isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within Brucella ceti and Brucella pinnipedialis. *BMC Microbiology,* **9**.

Marianelli, C., Graziani, C., Santangelo, C., Xibilia, M. T., Imbriani, A., Amato, R., Neri, D., Cuccia, M., Rinnone, S., and Di Marco, V. (2007). Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of Brucella isolates from humans in Sicily, Italy. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 2923-2928.

Marianelli, C., Petrucca, A., Pasquali, P., Ciuchini, F., Papadopoulou, S., and Cipriani, P. (2008). Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired Brucella infection. *Journal of Hospital Infection* **68**, 274-276.

Marín, C., Jimenez de Bagüés, M., Barberán, M., and Blasco, J. (1996). Comparison of two selective media for the isolation of Brucella melitensis from naturally infected sheep and goats. *Veterinary Record* **138**, 409-410.

Maurin, M. (2005). La brucellose à l'aube du 21e siècle. *Médecine et Maladies Infectieuses* **35**, 6-16.

Maurin, M. (2007). Brucella. *In* "Précis de Bactériologie Clinique" (J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq and P. Riegel, eds.), pp. 1377-1385. Edition ESKA.

Mayer-Scholl, A., Draeger, A., Göllner, C., Scholz, H. C., and Nöckler, K. (2010). Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described Brucella species. *Journal of Microbiological Methods* **80**, 112-114.

McDermott, J. J., and Arimi, S. M. (2002). Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Veterinary Microbiology* **90**, 111-134.

Megid, J., Mathias, L. A., and Robles, C. A. (2010). Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *Open Veterinary Science Journal* **4**, 119-126.

Mehelmli, N., and Bendjazia, L. (1990). Les brucelloses animales enquête séro-épidémiologique dans les wilayas de Constantine, Sétif et Oum El Bouaghi. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Memish, Z. A., and Balkhy, H. H. (2004). Brucellosis and international travel. *J Travel Med* **11**, 49-55.

Michaux-Charachon, S., Foulongne, V., O'Callaghan, D., and Ramuz, M. (2002). Brucella à l'aube du troisième millénaire : organisation du génome et pouvoir pathogène. *Pathologie Biologie* **50**, 401-412.

Mick, V., Le Carrou, G., Corde, Y., Game, Y., Jay, M., and Garin-Bastuji, B. (2014). Brucella melitensis in France: Persistence in Wildlife and Probable Spillover from Alpine Ibex to Domestic Animals. *PLoS ONE* **9**, e94168.

Mokhtari, R., and Bengougam, M. (1990). Brucellose professionnelle: mythe ou réalité. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Moreno, E. (2002). Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology* **90**, 31-38.

Moreno, E., Cloeckaert, A., and Moriyon, I. (2002). Brucella evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* **90**, 209 - 227.

Morgan, W. J., Brinley, and MacKinnon, D. J. (1979). Brucellosis. *In* "Fertility and infertility in domestic animals" (J. A. Laing, ed.), pp. 171-198. Baillière Tindall, London.

Moyer, N., and Holcomb, L. (1988). Brucellosis. *In* "Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases" (A. Balows, W. J. Hausler, Jr., M. Ohashi, A. Turano and E. H. Lennete, eds.), pp. 143-154. Springer New York.

Muendo, E., Mbatha, P., Macharia, J., Abdoel, T., Janszen, P., Pastoor, R., and Smits, H. (2012). Infection of cattle in Kenya with Brucella abortus biovar 3 and Brucella melitensis biovar 1 genotypes. *Tropical Animal Health And Production* **44**, 17-20.

Muñoz, P. M., Marín, C. M., Monreal, D., González, D., Garin-Bastuji, B., Díaz, R., Mainar-Jaime, R. C., Moriyón, I., and Blasco, J. M. (2005). Efficacy of Several Serological Tests and Antigens for Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Presence of False-Positive Serological Results Due to Yersinia enterocolitica O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**, 141-151.

Navarro, E., Segura, J. C., Jesús Castaño, M., and Solera, J. (2006). Use of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction to Monitor the Evolution of Brucella melitensis DNA Load During Therapy and Post-Therapy Follow-Up in Patients with Brucellosis. *Clinical Infectious Diseases* **42**, 1266-1273.

Newby, D. T., Hadfield, T. L., and Roberto, F. F. (2003). Real-Time PCR Detection of Brucella abortus: a Comparative Study of SYBR Green I, 5′-Exonuclease, and Hybridization Probe Assays. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4753-4759.

Nguyen, T. C., and Fassi-Fehri, M. (1968). Etat actuel de la brucellose bovine au Maroc. *Maroc. Med.* **48**, 661-663.

O.I.E., F.A.O. O.M.S. (1995). "Directives FAO, OMS, OIE pour l'établissement d'un programme régional de prophylaxie de la brucellose au Moyen-Orient." FAO, OMS, OIE, Edictées et approuvées le 17 février 1993 à Amman, Jordanie et Amendées le 22 septembre 1995 à Maisons-Alfort, France.

O'Leary, S., Sheahan, M., and Sweeney, T. (2006). Brucella abortus detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science* **81**, 170-176.

Ocampo-Sosa, A. A., Aguero-Balbin, J., and Garcia-Lobo, J. M. (2005). Development of a new PCR assay to identify Brucella abortus biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet Microbiol* **110**, 41-51.

Ocholi, R.A., Kwaga, J. K. P., Ajogi, I., and Bale, J. O. O. (2004). Phenotypic characterization of Brucella strains isolated from livestock in Nigeria. *Veterinary Microbiology* **103**, 47-53.

OIE (2009). Chapitre : Brucellose Bovine. *In* "Manuel des tests de diagnostic et vaccins des animaux terestres" (OIE, ed.), *http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf.*

OIE (2014). Chapter 2.3.1: Bovine Brucellosis section 2.3 In "Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals". OIE, *http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf.*

Olsen, S. C. (2010). Brucellosis in the United States: Role and significance of wildlife reservoirs. *Vaccine* **28, Supplement 5**, F73-F76.

ONSSA (2013). Informations zoosanitaires nationals année 2013. *www.onssa.gov.ma.*

ONSSA (2014). Informations zoosanitaires nationales année 2014. *www.onssa.gov.ma.*

Osterman, B., and Moriyón, I. (2006). International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of Brucella : Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 1173-1175.

Ouadahi, F., Kassab, A., Benbernou, A., and Bouzouidja, F. (2004). Situation épidémiologique nationale et impact du programme de lutte contre la brucellose animale. *In* "Atelier maladies abortives des petits ruminants", 28 juin 2004-Alger.

Ouahrani, S., Michaux, S., Widada, J. S., Bourg, G., Tournebize, R., Ramuz, M., and Liautard, J.-P. (1993). Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in Brucella spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *Journal of General Microbiology* **139**, 3265-3273.

Ouar-Korichi, M. N. (1997). la brucellose: diagnostic et traitement. (L. l. d. l. prévention, ed.), Vol. n° 18 décembre 1997. Ministère de la Santé et de la Population. direction de la prévention.

Ould-Metidji, S., Hadj-Rabia, S., Benyahia, Y., Dif, A., Ami-Moussa, T., and Mokhtari, R. (1990). Résultats d'une enquête sur la brucellose humaine dans des domaines d'élevage de la région est d'Alger. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Pappas, G. (2010). The changing Brucella ecology: novel reservoirs, new threats. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36, Supplement 1**, S8-S11.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., and Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* **6**, 91-99.

Philipon, A., Renoux, G., and Plommet, M. (1970). Experimental bovine brucellosis. 3. The vaginal excretion of Brucella abortus before and after parturition. *Ann. Rech. vét* **1** 215-224.

Poester, F. P., Gonçalves, V. t. S. P., and Lage, A. P. (2002). Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology* **90**, 55-62.

Poitras, E., and Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*, **2 (2)**, 2-11.

Pouillot, R., Garin-Bastuji, B., and Dufour, B. (1998). Quelques clés pour le diagnostic de la brucellose bovine dans un contexte de réactions sérologiques faussement positives. *Le point vétérinaire* **vol.29, n°193**, 728-732.

Probert, W. S., Schrader, K. N., Khuong, N. Y., Bystrom, S. L., and Graves, M. H. (2004). Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of Brucella spp., B. abortus, and B. melitensis. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1290-1293.

Queipo-Ortuño, M. I., Colmenero, J. D., Bravo, M. J., García-Ordoñez, M. A., and Morata, P. (2008). Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. *Clinical Microbiology and Infection* **14**, 1128-1134.

Queipo-Ortuño, M. I., Colmenero, J. D., Reguera, J. M., García-Ordoñez, M. A., Pachón, M. E., Gonzalez, M., and Morata, P. (2005). Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clinical Microbiology and Infection* **11**, 713-718.

R.E.M. (2010). Situation épidémiologique de l'année 2011 sur la base des cas déclarés à L'I.N.S.P. Vol. XXI. INSP. Institut National de la Santé Publique,
http: //www.ands.dz/insp/insp-publicat.htm.

R.E.M. (2011). Situation épidémiologique de l'année 2011 sur la base des cas déclarés à L'I.N.S.P. Vol. XXII. INSP. Institut National de la Santé Publique,
http: //www.ands.dz/insp/insp-publicat.htm.

R.E.M. (2012). Situation épidémiologique de l'année 2011 sur la base des cas déclarés à L'I.N.S.P. Vol. XXIII. INSP. Institut National de la Santé Publique,
http: //www.ands.dz/insp/insp-publicat.htm.

Redjah, A. (1990). La brucellose humaine: aspect thérapeutiques. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa

Redkar, R., Rose, S., Bricker, B., and DelVecchio, V. (2001). Real-time detection of Brucella abortus, Brucella melitensis and Brucella suis. *Molecular and Cellular Probes* **15**, 43-52.

Refai, M. (2002). Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Veterinary Microbiology* **90**, 81-110.

Refai, M. (2003). Application of biotechnology in the diagnosis and control of brucellosis in the Near East Region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**, 443-449.

Renukaradhya, G. J., Isloor, S., and Rajasekhar, M. (2002). Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Veterinary Microbiology* **90**, 183-195.

Rodriguez-Torres, A., Landinez, R., and Abad, R. (1984). Espèces et biotypes de la brucellose humaine en Espagne. *Develop. biol. Standard* **Vol. 56**, 107-112. .

Romero, C., Pardo, M., Grillo, M. J., Diaz, R., Blasco, J. M., and Lopez-Goni, I. (1995). Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J Clin Microbiol* **33**, 3198-200.

Roux, J. (1984). Brucella. *In* "Bactériologie Médicale" (L. V. Le Minor, M., ed.), pp. 434-454 Flammarion Médecine-Sciences.

Samartino, L. E. (2002). Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology* **90**, 71-80.

Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.-J., and Nöckler, K. (2008). Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 375-382.

Scholz, H. C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.-J., and De, B. K. (2010). Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 801-808.

Scholz, H. C., and Vergnaud, G. (2013). Molecular characterisation of Brucella species. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **32**, 149-62.

Seleem, M. N., Boyle, S. M., and Sriranganathan, N. (2010). Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology* **140**, 392-398.

Sergent, E. (1908). Étude sur la fièvre méditerranéenne: recherches expérimentales en 1907. *Annales de l'Institut Pasteur, In "Recherches expérimentales sur la pathologie algérienne (microbiologie parasitologie), 1902-1909*, 235-265.

Sergent, E. (1908 a). La fièvre méditerranéenne en Algérie: note préliminaire. *In* "Bull. Soc. Path. Exot." (E. Sergent, ed.), Vol. T.I, pp. 235-265. recherches expérimentales sur la pathologie algérienne (microbiologie-parasitologie) 1902-1909.

Sergent, E., and Bories, C. (1908 b). Étude sur la fièvre méditerranéenne dans le village de Kléber (Oran) en 1907. *Annales de l'Institut Pasteur, In "Recherches expérimentales sur la pathologie algérienne (microbiologie-parasitologie), 1902-1909*, pp.235-265.

Sergent, E., Gillot, V., and Lemaire, G. b. (1908 c). Études sur la fièvre méditerranéenne chez les chèvres algéroises en 1907. *Annales de l'Institut Pasteur In "Recherches expérimentales sur la pathologie algérienne (microbiologie-parasitologie), 1902-1909*, 235-265.

Smirnova, E. A., Vasin, A. V., Sandybaev, N. T., Klotchenko, S. A., Plotnikova, M. A., Chervyakova, O. V., Sansyzbay, A. R., and Kiselev, O. I. (2013). Current Methods of Human and Animal Brucellosis Diagnostics.

Stauffer, C. o. L. (2002). Brucella spp. coloration de Gram *In* "Oregon State Public Health Laboratory". CDC, http://phil.cdc.gov/phil/details.asp.

Taleski, V., Zerva, L., Kantardjiev, T., Cvetnic, Z., Erski-Biljic, M., Nikolovski, B., Bosnjakovski, J., Katalinic-Jankovic, V., Panteliadou, A., Stojkoski, S., and Kirandziski, T. (2002). An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. *Veterinary Microbiology* **90**, 147-155.

Taoudi, A., Fassi-Fehri, M. M., Johnson, D. W., and Fagouri, S. (1984). Les biotypes des Brucella abortus rencontrés chez les bovins au Maroc: étude préliminaire. *Develop. biol. Standard* **Vol. 56**, 123-128. .

Tiller, R., Gee, J., Lonsway, D., Gribble, S., Bell, S., Jennison, A., Bates, J., Coulter, C., Hoffmaster, A., and De, B. (2010). Identification of an unusual Brucella strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology* **10**, 23.

Tiwari, A., Pal, V., Afley, P., Sharma, D., Bhatnagar, C., Bhardwaj, B., Rai, G., and Kumar, S. (2014). Real-time PCR carried out on DNA extracted from serum or blood sample is not a good method for surveillance of bovine brucellosis. *Tropical Animal Health And Production* **46**, 1519-1522.

Todd, P. (2014). Colonies de B. abortus sur gélose chocolat CDC, *http://phil.cdc.gov/phil/details.asp.*

Tourab, D., Nezzal, A. M., Gueroui, S., and Bachtarzi, T. (1990). Épidémiologie de la brucellose professionnelle dans la région de Annaba", Situation épidémiologique nationale de la brucellose humaine. *In* "Séminaire sur les Brucelloses", Ghardaïa 14 et 15 novembre 1990.

Valdezate, S., Navarro, A., Villalón, P., Carrasco, G., and Saéz-Nieto, J. A. (2010). Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human Brucella melitensis strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and rpoB typing. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 2734-2740.

Verger, J. M., and Grayon, M. (1984). Caractéristiques de 273 souches de Brucella abortus d'origine africaine. *Develop. biol. Standard* **Vol. 56**, 63-71.

Verger, J.-M., Grimont, F., Grimont, P. A. D., and Grayon, M. (1985). *Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **35**, 292-295.

Verger, J., Garin-Bastuji, B., Grayon, M., and Mahé, A. (1989). La brucellose bovine à Brucella melitensis en France. *Ann. Rech. Vet* **20**, 93-102.

Verger, J. M., and Grayon, M. (1992). Contribution de la biologie moléculaire à la taxonomie du genre Brucella. *In* "Prevention of brucellosis in Mediterranean countries" (M. Plommet, ed.), pp. 187-197. Pudoc, Wageningen.

Vergnaud, G., and Denoeud, F. (2000). Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Res* **10**, 899-907.

Vizcaíno, N., Cloeckaert, A., Verger, J.-M., Grayon, M., and Fernández-Lago, L. (2000). DNA polymorphism in the genus Brucella. *Microbes and infection* **2**, 1089-1100.

WAHID (2011). "Base de données du système mondial d'information sanitaire ". Organisation mondiale de la santé animale (OIE), *http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap.*

WAHID (2014). "Base de données du Système mondial d'information sanitaire." Organisation mondiale de la santé animale (OIE), *http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap.*

Whatmore, A., Perrett, L., and MacMillan, A. (2007). Characterisation of the genetic diversity of Brucella by multilocus sequencing. *BMC Microbiology* **7**, 34.

Whatmore, A. M. (2009). Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* **9**, 1168-1184.

Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckaert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D., Perrett, L. L., Koylass, M. S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H. C., Dick, E. J., Hubbard, G., and Schlabritz-Loutsevitch, N. E. (2014). Brucella papionis sp. nov. isolated from baboons (Papio spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Whatmore, A. M., and Gopaul, K. K. (2012). Recent advances in molecular approaches to Brucella diagnostics and epidemiology. *In* "Brucella: Molecular Microbiology and Genomics" (I. L.-G. a. D. O'Callaghan, ed.), pp. 57-88. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Whatmore, A. M., Shankster, S. J., Perrett, L. L., Murphy, T. J., Brew, S. D., Thirlwall, R. E., Cutler, S. J., and MacMillan, A. P. (2006). Identification and Characterization of Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Typing of Brucella spp. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 1982-1993.

Wyatt, H. V. (2009). Brucellosis and Maltese goats in the Mediterranean. *Journal of Maltese History* **1**, 4-19.

Wyatt, H. V. (2013). Lessons from the history of brucellosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **32**, 17-25.

Young, E., and Hall, W. (1998). Brucellosis. *In* "Bacterial Infections of Humans" (A. Evans and P. Brachman, eds.), pp. 155-167. Springer US.

Yu, W. L., and Nielsen, K. (2010). Review of detection of Brucella spp. by polymerase chain reaction. *Croatian Medical Journal* **51**, 306-313.

Zribi, M., Ammari, L., Masmoudi, A., Tiouiri, H., and Fendri, C. (2009). Aspects cliniques, microbiologiques et thérapeutiques de la brucellose : étude de 45 cas. *Pathologie Biologie* **57**, 349-352.

Zvala (1997). Gentamycin plus rifampin in the treatment of human brucellosis. *Inf. Circ. WHO Mediterr. Zoon. Control cent.* **43**, page 8.

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

ARTICLE

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Human Brucellosis in Maghreb: Existence of a Lineage Related to Socio-Historical Connections with Europe

Nedjma Lounes[2], Moulay-Ali Cherfa[1], Gilles Le Carrou[1], Abdellah Bouyoucef[3], Maryne Jay[1], Bruno Garin-Bastuji[1¤], Virginie Mick[1*]

1. EU/OIE/FAO & National Reference Laboratory for Brucellosis, Animal Health Laboratory, Paris-Est University/Anses, Maisons-Alfort, France, 2. Higher National Veterinary School (ENSV), Algiers, Algeria, 3. Institute of Veterinary Sciences, Saad Dahleb University, Blida, Algeria

*virginie.mick@anses.fr

¤ Current address: European & International Affairs Directorate, Paris-Est University/Anses, Maisons-Alfort, France

CrossMark

OPEN ACCESS

Citation: Lounes N, Cherfa M-A, Le Carrou G, Bouyoucef A, Jay M, et al. (2014) Human Brucellosis in Maghreb: Existence of a Lineage Related to Socio-Historical Connections with Europe. PLoS ONE 9(12): e115319. doi:10.1371/journal.pone.0115319

Editor: Axel Cloeckaert, Institut National de la Recherche Agronomique, France

Received: July 21, 2014

Accepted: November 21, 2014

Published: December 17, 2014

Copyright: © 2014 Lounes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors have no funding or support to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Despite control/eradication programs, brucellosis, major worldwide zoonosis due to the *Brucella* genus, is endemic in Northern Africa and remains a major public health problem in the Maghreb region (Algeria/Morocco/Tunisia). *Brucella melitensis* biovar 3 is mostly involved in human infections and infects mainly small ruminants. Human and animal brucellosis occurrence in the Maghreb seems still underestimated and its epidemiological situation remains hazy. This study summarizes official data, regarding *Brucella melitensis* infections in Algeria, from 1989 to 2012, with the purpose to provide appropriate insights concerning the epidemiological situation of human and small ruminant brucellosis in Maghreb. Algeria and Europe are closely linked for historical and economical reasons. These historical connections raise the question of their possible impact on the genetic variability of *Brucella* strains circulating in the Maghreb. Other purpose of this study was to assess the genetic diversity among Maghreb *B. melitensis* biovar 3 strains, and to investigate their possible epidemiological relationship with European strains, especially with French strains. A total of 90 *B. melitensis* biovar 3 Maghreb strains isolated over a 25 year-period (1989–2014), mainly from humans, were analysed by MLVA-16. The obtained results were compared with genotypes of European *B. melitensis* biovar 3 strains. Molecular assays showed that Algerian strains were mainly distributed into two distinct clusters, one Algerian cluster related to European sub-cluster. These results led to suggest the existence of a lineage resulting from socio-historical connections between Algeria and Europe that might have evolved distinctly from the Maghreb autochthonous group. This study provides insights regarding the epidemiological situation of human brucellosis in the

Maghreb and is the first molecular investigation regarding *B. melitensis* biovar 3 strains circulating in the Maghreb.

Introduction

Brucellosis, due to the *Brucella* genus, is a major worldwide zoonosis. Despite eradication programs, the disease remains endemic in many regions of the world, with predominance in the Mediterranean Basin, especially in Maghreb (Algeria, Morocco and Tunisia), Middle East, Africa, western Asia, Central and South America. The global burden of human brucellosis remains important: the World Health Organization (WHO) estimates that the infection causes more than 500,000 infections per year worldwide [1], with an important travel-association [2]. The observed incidence in the endemic areas can range from <0.03 to>200 per 100,000 population. Nevertheless, if human brucellosis is a notifiable disease in most countries, official reports do not exactly reflect the number of persons affected every year (clinical polymorphism, political management, *etc.*) and WHO considers that the real incidence of this disease is 10–25 times superior to the notified [3].

Brucellosis affects wild and domestic mammals, especially cattle, small ruminants and swine, causing abortion and reduced fertility. The disease is transmitted to human through ingestion of contaminated dairy products (raw milk and unpasteurized cheeses) [2], as well as by direct contacts (cutaneous/mucous and aerosol inhalation) with infected animals or biological materials (carcass, abortion products, clinical samples).

Although animal and human brucellosis have been reported for a long time in Africa, the brucellosis occurrence in Maghreb was underestimated and its epidemiological situation remains poorly documented. In 1982, the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) stated the absence of *Brucella melitensis* in Algeria and in Morocco and its sporadic occurrence in Tunisia in goats and humans [4]. However, from the mi-1980s-1990s, the increase of human brucellosis in Algeria [5], Morocco [6] and Tunisia [7,8] alerted the health authorities to the existence of an animal reservoir. *Brucella melitensis* infects mainly sheep and goats and is the major responsible for human infections, especially the predominant biovar (bv) 3 in Mediterranean countries [9–11].

Algeria and Morocco are important breeding countries, with a significant number of small ruminants (>22 million heads), while Tunisia has almost 9 million of sheep and goats [12]. Despite a lack of epidemiological data, it is admitted the disease is endemic in Maghreb, with brucellosis prevalence in small ruminants ranging from 0.1% for Morocco to 6% and 7.5%, respectively for Algeria and Tunisia [13].

The occurrence of human brucellosis depends largely on the animal reservoir. For preventing human brucellosis, the most efficient approach is the control and

elimination of the animal infection. In Algeria, Morocco and Tunisia, similar control and eradication programs against brucellosis in small ruminants are applied, based on various strategies: mass vaccination in Algeria and Tunisia and authorized in Morocco and/or testing and slaughter of infected animals [9, 13–14]. However, in these areas where the animal infection is not yet controlled, the heat treatment (pasteurization) of dairy products is not systematic and certain food habits and faiths (consumption of raw milk/cheese) and/or inadequate hygienic practices related to poverty increase transmission to humans [15].

In non-endemic countries with controlled animal infection, human brucellosis occurrence is mainly due to imported cases from endemic areas, including Maghreb. France is in this case since it has been officially-free from bovine brucellosis since 2005 and no case has been reported in domestic and wild ruminants since 2003, except the recent outbreak in Haute-Savoie [16].

Molecular typing methods can be used for trace-back and trace-forward analysis which may help to identify infection origin and spreading route. The genetic diversity of *Brucella* strains isolated from human and animal infections has not yet been investigated in countries of Maghreb.

In the present study, the MLVA-16 (Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis) assay, optimal strategy of *Brucella* molecular typing [17], was applied (*i*) to investigate epidemiological relationships among human and animal brucellosis isolates collected from different countries of Maghreb over 25 years (1989–2014), (*ii*) to determine the most common genotypes among *Brucella* strains in this region and (*iii*) to investigate their possible epidemiological relationship with European strains, especially with French strains.

Materials and Methods

Data source

Epidemiological data were extracted from human brucellosis cases occurred during 1990–2012 in France and during 1989–2011 in Algeria, reported respectively from the French institute for public health surveillance (InVS) and the Algerian institute for public health (INSP), where brucellosis is a notifiable disease, as well as from EFSA data [15, 18–19]. Population data were obtained from the French Institute of Statistics and Economic studies [20]. The number of imported cases to France from Maghreb was completed with data from InVS. Regarding brucellosis in small ruminants, data were extracted from OIE interfaces: Handistatus II system [21] for the years before 2005 screening the caprine and ovine brucellosis excluding *B. ovis* [OIE code B152], and WAHIS (World Animal Health Information System) [22] providing data from 2006, selecting "Brucellosis (*Brucella melitensis*) (2006-)". OIE defines the "cases" as the animals affected by the disease, *i.e.* sick animals and the animals that died from the disease.

Brucella strains

Ninety strains, isolated mainly from humans and also from animals (one bovine and two ovine strains), from 1989 to 2014 (S1 Table), were obtained from the ANSES collection, except for one bovine strain, obtained from a routine epidemiological veterinary investigation conducted in Algeria in 2011–2014 (Lounes N, personal data). All isolates were confirmed as *B. melitensis* bv 3 using the classical microbiological methods, based on CO_2 requirement, H_2S production, urea hydrolysis, agglutination with monospecific sera, fuchsin and thionin dye sensitivity and phage typing [23].

Although most strains were isolated in France, all have a Maghreb geographical origin: 56 strains isolated from Algeria, including some strains isolated from a same patient (2 patients with two strains each: M021/M022 and M069/M070), as well as from a mother and her son (M029/M030) or from the same family (M060/M062), with 3 laboratory-acquired infections (M012/M020, M054/M055/M059, M071/M072), 14 strains isolated from Morocco (including from one husband and his wife: M035/M036) with 1 strain from laboratory-acquired infection (M001/M007), 13 strains isolated from Tunisia (including two strains from a same patient: M044/M049), and 7 strains from *largo sensu* Maghreb (when the country origin was not clearly determined) (S1 Table) with 1 related strain from laboratory-acquired infection (M024/M025).

Two reference strains *B. melitensis* bv 1 str. 16M (M093) and *B. melitensis* bv 3 str. Ether (M092), as well as one *B. melitensis* bv 3 human isolate from Turkey (M091) were included as controls for molecular analysis.

Molecular approaches

Brucella DNA sample was prepared using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, France), according to the manufacturer's instructions. A *Brucella* genus-specific real-time PCR (RT-PCR) (Applied Biosystems, France) was performed on DNA extracts, as previously described [24]. The *B. melitensis* bv 3 strains were characterized by MLVA-16, as previously described [17, 25].

Data analysis

Fragment sizes converted to repeat unit (U) numbers [25] were analyzed as a character data set, using BioNumerics v6.6 (Applied Maths, Belgium). According to the molecular evolution, weights were assigned to the distinct panels (weights of 2, 1 and 0.1, respectively for the panel 1, panel 2A and panel 2B) [17]. MLVA genotypes were identified into the database *Brucella* 2012 (Orsay, France) (http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/). The cluster analysis was performed using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method Algorithm) algorithm or using a Minimum Spanning Tree (MST) with Euclidean distance matrices. Regarding the wide world circulation of *B. melitensis* bv 3, especially in Europe and in Maghreb,

the cluster analysis was extended to 507 published MLVA patterns, including MLVA genotypes of the Maghreb strains investigated in this study [17, 25–31].

The Hunter & Gaston diversity index (HGDI) of each locus was determined (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl). The HGDI values can range from 0.0 (no diversity) to 1.0 (complete diversity).

Results and Discussion

This study is the first molecular investigation regarding the *Brucella* strains circulating in Maghreb (Algeria, Morocco and Tunisia) over a 25 year-period (1989–2014), including strains isolated from patients diagnosed in France, but whose contamination origin was undoubtedly Maghreb.

Overview of human and animal brucellosis in Maghreb: focus on Algeria

Brucellosis is endemic in the Mediterranean basin, especially in the Northern African countries [1, 32]. Until the 1980s, the epidemiological situation was not well known in Maghreb and cases of human brucellosis were rarely reported in Algeria, Morocco and Tunisia because the infection was misdiagnosed or ignored, despite an important animal reservoir [12]. Since the middle of 1980s, several outbreaks, as the Ghardaïa (Southern Algeria) outbreak in 1984 resulting in more than 600 human cases [33], the Gafsa (Southern Tunisia) outbreak in 1991 with more than 400 human cases [34], have shaken the public health services and led to the implementation of control and eradication measures, regarding animal brucellosis as well as human brucellosis [14]. Despite these adopted control measures, the disease is still present [35], and although brucellosis is a notifiable disease in Maghreb countries, incidence is still underestimated and/or under-reported, as the low human incidence suggests (8.43 annual cases per 100,000 population in Algeria in 2006) [1].

Fig. 1A shows the *B. melitensis* incidence reported in Algeria both in humans and animals (S2 Table). The incidence of human brucellosis in Algeria shows an upward trend since 1990, with values ranging from 0.36 in 1989 to 16.76 per 100,000 inhabitants in 2011, reaching 23–24.6 in 2005–2007 and up to 28 in 2010. This increase could be the result of diagnosis and surveillance improvement. As expected, the numbers of new animal and human cases reported from Algeria follow a similar trend, highlighting the impact of the animal reservoir on the Public Health (Fig. 1A). Human incidence might reflect the true epidemiological situation of brucellosis in animals. However, while new annual human cases reported from Algeria are important, prevalence reported in small ruminants in Algeria remains low (in 2009 only 6% in sheep and goat [13]), questioning the reliability of the compulsory notification.

In France, where ruminant brucellosis has been eradicated since 2000s, incidence of human brucellosis followed a constant decline from 1990 to 2000

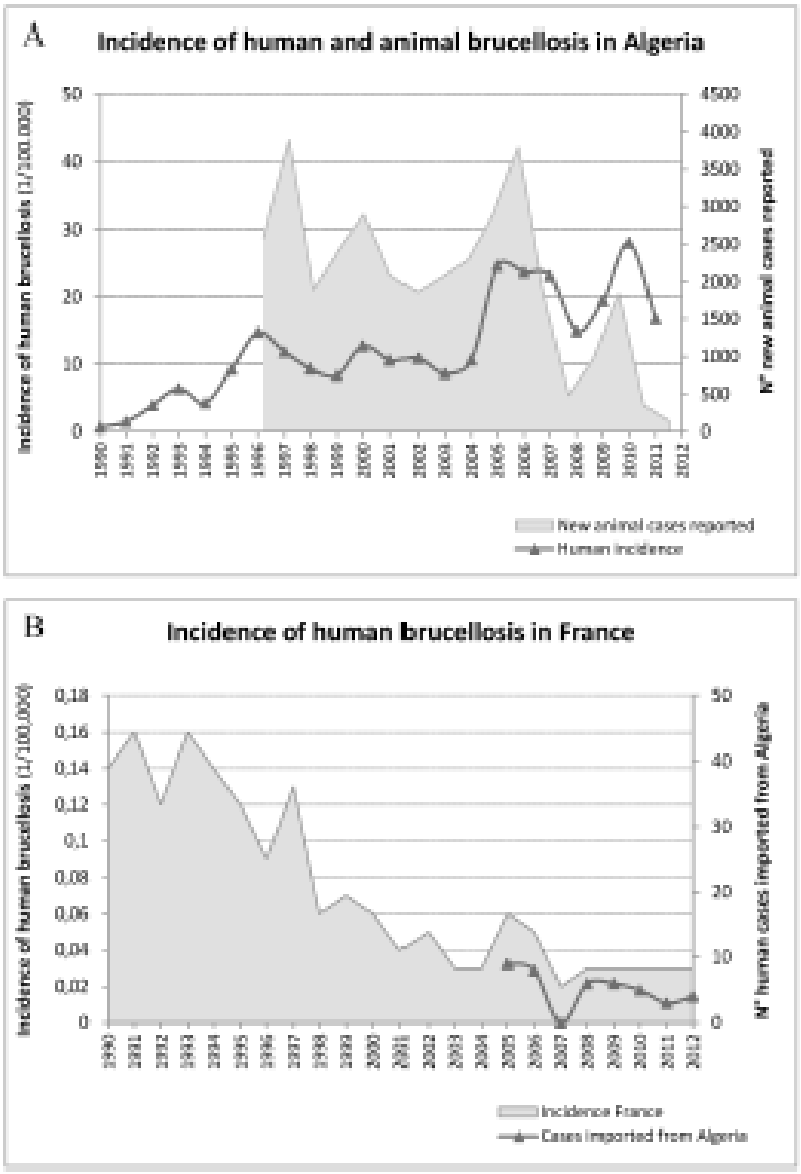


Fig. 1. Incidence of *B. melitensis* human and animal brucellosis in Algeria, vs incidence of human brucellosis in France and number of human cases imported from Algeria to France. A: Incidence of human and animal brucellosis in Algeria (1/100,000 inhabitants); B: Incidence of human brucellosis in France (1/100,000 inhabitants) and number of human cases imported from Algeria to France. The x-axis indicates the year. The y-axis represents (A) incidence of human brucellosis or number of new animal cases reported in Algeria and (B) incidence of human brucellosis in France or number of new human *B. melitensis* cases imported from Algeria to France.

doi:10.1371/journal.pone.0115819.g001

(Fig. 1B). The incidence rate is currently stable and lower than 0.04 per 100,000 inhabitants in 2012, with 23 reported cases (including 19 imported cases). Indeed, annual reported cases are mainly due to imported cases from endemic areas and

are epidemiologically investigated by InVS to determine risk factors and the putative infection source (travel in endemic area, contaminated raw milk/cheese consumption, infected animal contacts…). These human cases imported from Maghreb, but diagnosed in France (Fig. 1B), are thus reported with certainty and their incidence curve shows the same pattern than human brucellosis in Algeria (Fig. 1). For social and historical reasons, migration flows from Algeria are important to France. Analysis of the epidemiological situation of brucellosis diagnosed in France, but originated from Maghreb, especially from Algeria, might reflect the epidemic features of human and animal brucellosis in Maghreb. Nevertheless, a time-lag of one year was observed between both curves (cases imported to France and Algerian incidence), suggesting an improved diagnosis in France.

In addition, WHO considers human brucellosis as a neglected disease of poverty [36]. The percentage of the population living in poverty is important in Maghreb (24% for Algeria population; 36 millions) [37]. Despite education campaigns, social and food habits remain, especially in rural areas, where the population lives in close contact with animals; consumption of unpasteurized products is responsible of 85% of human infections in Algeria [38–39].

Genetic diversity of MLVA-16 molecular markers for the Maghreb strains

The HGDI for each MLVA-16 locus was calculated from 90 Maghreb *B. melitensis* bv 3 strains, and compared to published global HGDI data for *B. melitensis* bv 3 strains [31] (Table 1). HGDI values ranged from 0.000 to 0.022 in panel 1, from 0.022 to 0.585 in panel 2A and from 0.000 to 0.802 in panel 2B. The loci of panel 1, as well as the Bruce21 of panel 2A, with values closed to zero, present no discriminatory power for the epidemiological situation of the investigated strains. Interestingly, and contrary to published HGDI [40], HGDI values of Bruce30 (panel 2B) displayed no informational nature in this study, with HGDI values of 0.000.

As expected with the global data, the most variable loci (with HGDI values given in brackets) belonged to panel 2B: Bruce09 (0.802), Bruce16 (0.802), Bruce07 (0.800) and Bruce04 (0.782).

Genotypes and clusters

All investigated strains (n=90), excluding the control strains (*B. melitensis* bv 1 16 M and *B. melitensis* bv 3 Ether, as well as the Turkey strain M091), belonged to the West Mediterranean group (S1 Table) [17]. All Maghreb strains harbored a MLVA-8 (only panel 1) genotype 51, except one (M002) with the genotype 88 and one (M035) showing a new genotype (S1 Table). They fell into 10 MLVA-11 (panel 1 and panel 2A) genotypes: predominant genotypes 92 and 94, each with 29 strains (32.2%), followed by the genotype 96 (16 strains; 17.8%), other previously described: 91 (4 strains; 4.5%), 155 (1 strain; 1.1%), a genotype matching with the

Table 1. *B. melitensis* bv 3 HGDI values for each MLVA-16 genetic marker (from this study and from published data).

	Locus	HGDI from obtained results in this study				Global HGDI*			
		Diversity Index (n = 90)	Confidence Interval	K	max(pi)	Diversity Index (n)	Confidence Interval	K	max(pi)
Panel 2B	Bruce04	0.782	0.743–0.821	8	0.311	0.765 (507)	0.745–0.785	10	0.377
	Bruce07	0.800	0.767–0.834	7	0.311	0.676 (507)	0.641–0.710	10	0.518
	Bruce09	**0.862**	0.731–0.874	14	0.411	0.637 (507)	0.592–0.683	15	0.588
	Bruce16	**0.862**	0.770–0.834	7	0.300	**0.838** (507)	0.828–0.849	11	0.245
	Bruce30	0.000	0.000–0.077	1	1.000	0.693 (507)	0.664–0.721	7	0.480
Panel 2A	Bruce18	0.585	0.528–0.641	4	0.522	0.582 (432)	0.541–0.624	7	0.595
	Bruce19	0.542	0.475–0.609	3	0.589	0.577 (432)	0.540–0.615	7	0.583
	Bruce21	0.022	0.000–0.065	2	0.989	0.009 (432)	0.000–0.022	2	0.995
Panel 1	Bruce06	0.000	0.000–0.077	1	1.000	0.466 (432)	0.442–0.490	2	0.632
	Bruce08	0.022	0.000–0.065	2	0.989	0.085 (432)	0.049–0.121	4	0.956
	Bruce11	0.000	0.000–0.077	1	1.000	0.000 (432)	0.000–0.017	1	1.000
	Bruce12	0.000	0.000–0.077	1	1.000	0.093 (432)	0.056–0.131	3	0.951
	Bruce42	0.022	0.000–0.065	2	0.989	0.663 (432)	0.654–0.672	4	0.370
	Bruce43	0.000	0.000–0.077	1	1.000	0.504 (432)	0.479–0.529	4	0.595
	Bruce45	0.000	0.000–0.077	1	1.000	0.000 (432)	0.000–0.017	1	1.000
	Bruce55	0.000	0.000–0.077	1	1.000	0.466 (432)	0.442–0.490	2	0.632

Hunter Gaston Diversity Index (HGDI): Measure of the variation of the number of repeats at each locus. Ranges from 0.0 (no diversity) to 1.0 (complete diversity); Confidence Interval: Precision of the Diversity Index, expressed as 95% upper and lower boundaries; K: Number of different repeats present at this locus in this sample set; max(pi): Fraction of samples that have the most frequent repeat number in this locus (range 0.0 to 1.0); n: strains number according to the considered locus; in bold: locus more variable. *: [17,25–31].

doi:10.1371/journal.pone.0115319.t001

Italian strain #11789 [41] (2 strain; 2.2%) and four new genotypes (5 strains, 5.6%; 2 strains, 2.2%; 1 strain, 1.1%; 1 strain, 1.1%) (S1 Table). Interestingly, the genotype 94 seems to be shared only by the Maghreb strains, although in the public database *Brucella* 2012, some strains identified as non Maghreb strains harbor this genotype 94, e.g. BCCN#03-13, a strain isolated in 2003 in France [17]. These strains might be epidemiologically misidentified.

As previously described, MLVA-11 allows assessing global phylogeographic relationship [30]. MLVA-11 cluster analysis based on 497 worldwide *B. melitensis* bv 3 strains, including the Maghreb strains investigated in this study, was performed (Fig. 2). The strains were divided into three clusters: West Mediterranean, East Mediterranean and American clusters [17]. As previously described, the East Mediterranean group essentially contained the strains isolated from Turkey (including M091) [42], China [40, 43], Germany and Greece, while the West Mediterranean group was constituted by the European strains (Italy, Spain, France, Switzerland) [26–27, 30–31] and the Maghreb strains (Algeria, Morocco, Tunisia) (this study).

Phylogenetic relationships of the Maghreb *B. melitensis* bv 3 isolates were revealed by a concatenated dendrogram based on MLVA-16 genotyping (Fig. 3).

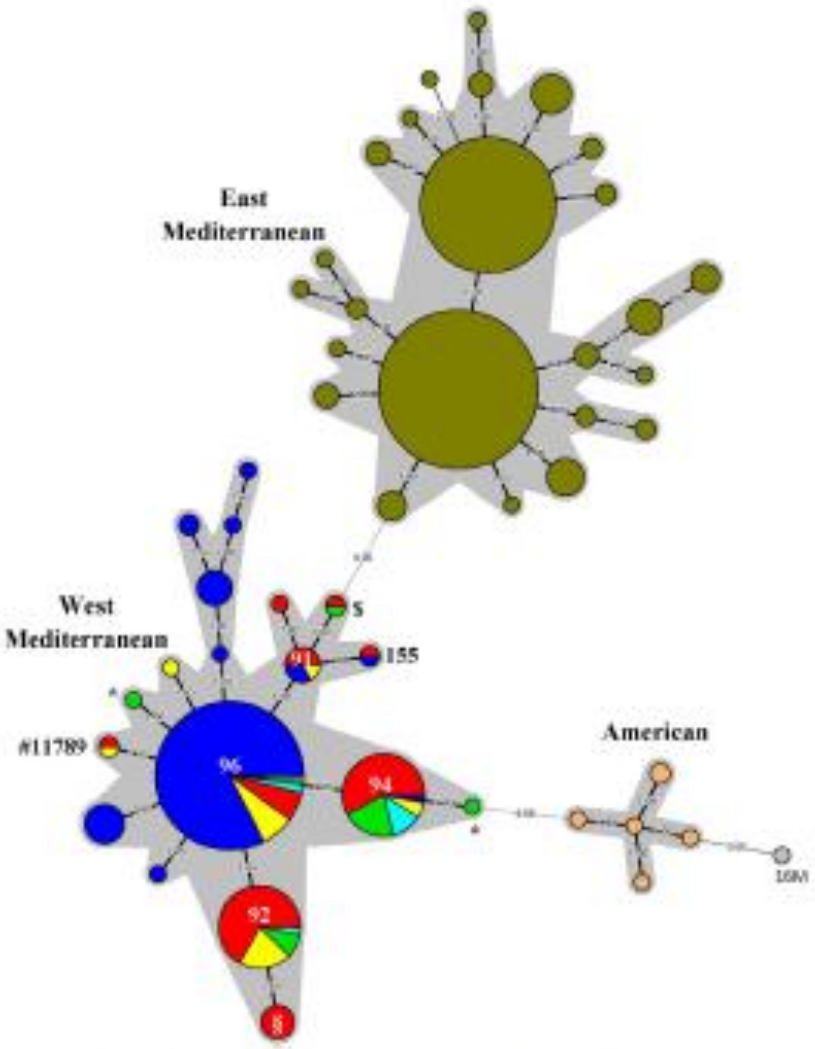


Fig. 2. MST of clustered MLVA-11 genotypes of the worldwide *B. melitensis* bv 3 isolates. The MST was constructed with a categorical coefficient (with panel weights). Size of circles reflects the number of isolates with a particular MLVA genotype. Width of the line reflects the genetic distance between the genotypes (heavy short lines connect SLVs, thin longer lines connect DLVs). Each country/group is assigned a different colour, *i.e.* isolates from Algeria are coloured in red, isolates from Morocco in green, isolates from Tunisia in yellow, isolates from *largo sensu* Maghreb in light blue, West Mediterranean isolates from Europe in blue, East Mediterranean isolates (n = 257) in khaki, American isolates in orange and the *B. melitensis* bv 1 reference strain 16 M in grey. Regarding the West Mediterranean group, the MLVA-11 genotypes identified in this study were indicated (S1 Table).

doi:10.1371/journal.pone.0115819.g002

MLVA-16 genotypes of the European strains (France, Spain, Italy) were added in the distance matrix construction ([26–27, 30–31] and personal results). The detailed dendrogram is shown in the S1 Figure. The investigated strains in this study were distributed into 55 MLVA-16 genotypes. Excluding the *B. melitensis* bv 1 16 M reference strain (cluster D) and the Algerian human strain M038 (cluster C), all Maghreb and Europe *B. melitensis* bv 3 strains (n = 215) clustered into 2

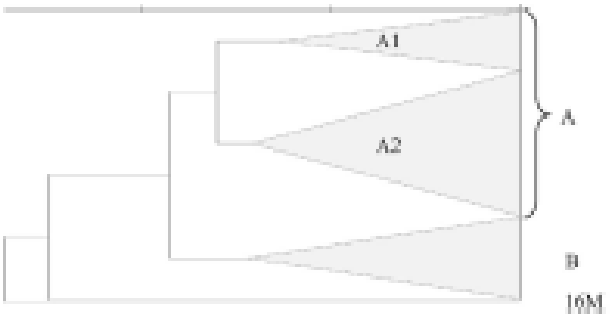


Fig. 3. Concatenated dendrogram of clustered MLVA-16 genotypes of Europe and Maghreb isolates. The dendrogram was constructed with a categorical coefficient and UPGMA algorithm. Clusters are coded as A and B, and sub-clusters as A1–A2. MLVA-16 genotypes of all investigated strains and strain details are shown in S1 Figure.

doi:10.1371/journal.pone.0115819.g008

clusters, designated A and B, with respectively 153 strains (71.2%) and 62 strains (28.8%) (S1 Figure).

Interestingly, with a >98% similarity cut-off, the Algeria strains were distributed into two distinct clusters (clusters A and B), one Algerian cluster (subcluster A1 with 44 strains mainly originated from Maghreb) related to the Moroccan strains and very close to the European cluster (subcluster A2 with 109 strains mostly isolated from Europe), while the other Algerian cluster (cluster B) was closer to the Tunisian strains (Fig. 3). These results suggest that these two sublineages could reflect the existence of an autochthonous lineage from Maghreb (cluster B), as well as an "historical lineage" (cluster A), resulting from historical and economical connections between Algeria and Europe. Previous Pulsed-Field Gel Electrophoresis studies performed from France and Algeria strains, after *Xho*I and *Xba*I restrictions, already highlighted the existence of two patterns: an autochthonous Algerian pattern and a "colonial" pattern [44]. Former movements of infected animals from Europe to Maghreb (*e.g.* brucellosis seropositive pregnant cows from France in the 1970's, goats from Malta or Spain at the end 19th century…) [45] are described and might be involved in the existence of this imported pattern. Our current investigation, based on more discriminative methods, seems to support this assumption.

Furthermore, these results highlighted some geographical patterns, probably related to socioeconomic links between Tunisia/Algeria and Morocco/Algeria (*e.g.* bilateral trade; breeding systems: grazing, transhumance; uncontrolled animal movement across borders…). However, so far, the lack of specific geographical location of studied strains, as well as insufficient sampling from Morocco and Tunisia do not allow the full confirmation of this scenario.

Some epidemiologically related strains, *i.e.* isolated from a same patient, from some members of the same family and from patient/laboratory-acquired infection, were investigated. As expected, the most related strains (M001/M007; M021/M022; M024/M025; M029/M030; M044/M049; M054/M055/M059; M060/M062; M069/M070; M071/M072) harbored a strictly identical MLVA-16

genotype. However, it was more surprising to note that some epidemiologically related strains showed small variations in their MLVA-16 patterns. The most important difference concerns the genotypes of strains isolated from a husband (M035) and his wife (M036), with some differences on each panel: 1 U on Bruce42 (panel 1), 2 U on Bruce18 (panel 2A) and 4 U on Bruce09 (panel 2B), suggesting distinct infection sources. A similar result was observed for strains isolated from a patient and a technician contaminated directly from a sample of this patient (M012/M020) harbored distinct genotypes, with small variations in the number of repeats (1 U) on two loci (Bruce04 and Bruce07) of the hypervariable panel 2B.

Conclusions

Although Maghreb is an endemic area with an important animal reservoir, the epidemiological situation remains hazy. Incidence of human and animal brucellosis is yet underestimated and under reported in these countries.

This study provides insights regarding the epidemiological situation of human brucellosis in Maghreb and describes for the first time the molecular characterization of *B. melitensis* strains circulating in Algeria, Morocco and Tunisia. The current molecular typing method with high resolution discrimination MLVA-16 allows clustering the Maghreb strains into two geographical lineages, suggesting the existence of a Maghreb autochthonous group and a lineage resulting from socio-historical connections with Europe.

Supporting Information

S1 Figure. Detailed dendrogram of clustered MLVA-16 genotypes of the Maghreb and Europe *B. melitensis* bv 3 isolates. The dendrogram was constructed with a categorical coefficient and UPGMA algorithm. Clusters are coded as A–D, and sub-clusters as A1–A2. Each country is assigned a different colour, *i.e.* isolates from Algeria are coloured in red and isolates from Morocco in green. MLVA-16 data for each strain were shown.
doi:10.1371/journal.pone.0115319.s001 (DOCX)

S1 Table. *B. melitensis* biovar 3 strains isolated from different geographical origins, investigated in this study and MLVA genotype results.
doi:10.1371/journal.pone.0115319.s002 (DOCX)

S2 Table. Data of small ruminant brucellosis reported in Algeria.
doi:10.1371/journal.pone.0115319.s003 (DOCX)

Acknowledgments

The authors would like thank Yannick Corde and Antoine Drapeau for their technical support, and Gabriela Vecchio for her logistic expertise.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VM. Performed the experiments: NL MAC GLC. Analyzed the data: MJ VM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MAC GLC. Wrote the paper: NL VM. Contribution to the drafting: AB BGB. Had the final responsibility for the decision to submit for publication: VB. Provided substantive contributions to the article and approved the final manuscript: VM NL MAC GLC AB MJ BGB.

References

1. **Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Talamos EV** (2006) The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis 6: 91–99.
2. **Memish ZA, Balkhy HH** (2004) Brucellosis and international travel. J Travel Med 11(1): 49–55.
3. WHO; U.K. Department for International Development Animal Health Programme; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Organisation for Animal Health. The control of neglected zoonotic diseases: A route to poverty alleviation. Report of a joint WHO/DFID-AHP meeting; September 20 and 21, 2005; WHO headquarters, Geneva, with the participation of FAO and OIE. Geneva: WHO; 2006. Available: http://www.who.int/zoonoses/Report_Sept06.pdf. Accessed 2014 May 13.
4. **Nicoletti P** (1992) Diagnosis and vaccination for the control of brucellosis in the Near East. In FAO Animal Production and Health Paper (FAO), n°98, Rome (Italy).
5. **Benhabyles N, Benkirane A, Boudilmi B, Benchouk S, Bouayoun H** (1992) Epidémiologie de la brucellose humaine et animale au Maghreb. In Prevention of brucellosis in the Mediterranean countries: Proceedings of the international seminar organized by CIHEAM, CEC, MINAG (Malta), FIS (Malta), Valletta, Malta, 28–30 october 1991. CIHEAM Publication n°1, 1992. Pudoc Scientific Publishers Wageningen [in French].
6. Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte contre les Maladies (DELM), Ministère de la Santé, Morocco. Bulletins épidémiologiques (BE). Available: http://srvweb.sante.gov.ma/Publications/Bulletins/Documents/bulletin%20epidemiologique.htm. Accessed 2014 May 13 [in French].
7. **El Hicheri K, El Bahri S** (1992) La brucellose en Tunisie. In Prevention of brucellosis in the Mediterranean countries: Proceedings of the international seminar organized by CIHEAM, CEC, MINAG (Malta), FIS (Malta), Valletta, Malta, 28–30 october 1991. CIHEAM Publication n°1, 1992. Pudoc Scientific Publishers Wageningen [in French].
8. **Zribi M, Ammari L, Masmoudi A, Tibaïri H, Fendri C** (2009) Clinical manifestations, complications and treatment of brucellosis: 46-patient study. Pathol Biol (Paris) 57(5): 349–52.
9. **Benkirane A** (2006) Ovine and caprine brucellosis: World distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. Small Ruminant Res 62: 19–25.
10. **Boudilmi B, Chalabi N, Mouzzis A** (1990) Brucellose animale et humaine dans l'ouest algérien. Quelques résultats bactériologiques et sérologiques. Brucellosis meeting of Chlef/a's (Algeria), November 14–15, 1990 [in French].
11. **El Idrissi AH** (1996) Brucellose des petits ruminants. Enquête épidémiologique dans l'oriental. Projet FAO/TCP/MOR/4555A [in French].
12. **Refai M** (2002) Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol 90(1–4): 81–110.
13. **Akakpo AJ, Tiko-Agbo A, Koné P** (2000) L'impact de la brucellose sur l'économie et la santé publique en Afrique. Conf. OIE, 71–84 [in French].
14. **Lounes N** (2000) Historique du dépistage et prophylaxie de la brucellose bovine en Algérie. Recueil des ateliers d'épidémiologie animale 1: 5–8 [in French].
15. **European Food Safety Authority** (2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. EFSA Journal 10: 2597.

16. Garin-Bastuji B, Hars J, Drapeau A, Cherfa M, Game Y, et al. (2014) Re-emergence of *Brucella melitensis* in wildlife, France. Emerg Infect Dis 20(9).

17. Al Dahouk S, Le Flèche P, Nockler K, Jacques I, Grayon M, et al. (2007) Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. J Microbiol Met 69: 137–145.

18. Institut de veille sanitaire (InVS), Ministère de la Santé, France. Available: http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Zoonoses/Brucellose/Données-epidemiologiques. Accessed 2014 May 13 [in French].

19. Institut National de Santé Publique (INSP), Ministère de la Santé, Algeria. Relevés Epidémiologiques Mensuels (REM). Available: http://www.ands.dz/insp/insp-publicat.htm. Accessed 2014 May 13 [in French].

20. Institut National de la Statistique et des études économiques (INSEE), France. Available: http://www.insee.fr/fr/default.asp. Accessed 2014 May 13 [in French].

21. World Organisation for Animal Health. Handistatus II: zoonoses (Multiannual animal disease status): global cases of brucellosis. Available: http://web.oie.int/hs2/report.asp?lang=en. Accessed 2014 October 22.

22. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. Available: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail. Accessed 2014 October 22.

23. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988) Techniques for the brucellosis laboratory. INRA Publications, Paris, France.

24. Bounaadja L, Albert D, Chenais B, Henault S, Zygmunt MS, et al. (2009) Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS*711*, *bcsp31* and *per* target genes. Vet Microbiol 137(1–2): 156–64.

25. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, et al. (2006) Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. BMC Microbiol 6: 9.

26. Alvarez J, Saez JL, Garcia N, Serrat C, Perez-Sancho M, et al. (2011) Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain. Res Vet Sci 90: 208–211.

27. Valdezate S, Navarro A, Villalón P, Carrasco G, Saiz-Nieto JA (2010) Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and rpoB typing. J Clin Microbiol 48(8): 2734–40.

28. Marianelli C, Graziani C, Santangelo C, Xibilia MT, Imbriani A, et al. (2007) Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in sicily, Italy. J Clin Microbiol 45: 2923–2928.

29. Marianelli C, Petrucca A, Pasquali P, Ciuchini F, Papadopoulou S, et al. (2008) Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired *Brucella* infection. J Hosp Infect 68: 274–276.

30. Garofolo G, Di Giannatale E, De Massis F, Zilli K, Ancora M, et al. (2013) Investigating genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Italy with MLVA-16. Infect Genet Evol 19: 59–70.

31. Mick V, Le Carrou G, Corde Y, Game Y, Jay M, et al. (2014) *Brucella melitensis* in France: MLVA suggests the persistence in wildlife and a probable spill-over from Alpine Ibex to domestic animals and humans. PLoS One 9(4): e94168.

32. Saleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N (2010) Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Vet Microbiol 140: 392–398.

33. Cherif A, Benelmouffok A, Doudou A (1986) Consumption of goat cheese and human brucellosis in Ghardaïa (Algeria). Arch Inst Pasteur Alger 55: 9–14.

34. Bouzouaia N, Chakroun M, Rachdi J, Rachdi T (1995) Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of brucellosis in Tunisia. Apropos of epidemics in Gafsa. Tunis Med 73(11): 443–8.

35. Al-Anazi KA, Al-Jasser AM (2013) Brucellosis: A Global Re-emerging Zoonosis. In Bacterial and Mycotic Infections in Immunocompromised Hosts: Clinical and Microbiological Aspects. Ed: Mascellino MT. Accessed: http://esciencecentral.org/ebooks/. Accessed 2014 May 13.

36. World Health Organization (2006) The Control of Neglected Zoonotic Diseases: A route to poverty alleviation. World Health Organization, Food and Agriculture Organization and World Organization for

Animal Health, Geneva, Switzerland. Available: http://www.who.int/zoonoses/Report_Sept06.pdf. Accessed 2014 October 22.

37. Hotez PJ, Savioli L, Fenwick A (2012) Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. PLoS Negl Trop Dis 6(2): e1475.

38. Benkirane A (2001) Surveillance épidémiologique et prophylaxie de la brucellose des ruminants: l'exemple de la région Afrique du Nord et Proche-Orient. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz 20 (3), 757–767 [in French].

39. Aggad H, Boukraa L (2006) Prevalence of bovine and human brucellosis in western Algeria: comparison of screening tests. East Mediterr Health J 12(1–2): 119–28.

40. Jiang H, Wang H, Xu L, Hu G, Ma J, et al. (2013) MLVA genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates from different animal species and humans and identification of *Brucella suis* vaccine strain S2 from cattle in China. PLoS One 8(10): e76332.

41. Garofolo G, Ancora M, Di Giannatale E (2013) MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. J Microbiol Methods 92(2): 103–7.

42. Kilic S, Ivanov IN, Durmaz R, Bayraktar MR, Ayaslioglu E, et al. (2011) Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Genotyping of Human *Brucella* Isolates from Turkey. J Clin Microbiol 49: 3276–3283.

43. Jiang H, Fan M, Chen J, Mi J, Yu R, et al. (2011) MLVA genotyping of Chinese human *Brucella melitensis* biovar 1, 2 and 3 isolates. BMC Microbiol 11: 256.

44. Cloeckaert D, Thiébaud M, Garin-Bastuji B (2001) Evidence of genomic heterogeneity within the biovar 3 of *Brucella melitensis* by PFGE. X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology Salsomaggiore – Parma, Italy, 4–7 july 2001.

45. Benaissa A, Benaouf H (1984) Prophylaxie de la brucellose bovine dans les unités d'élevage du secteur socialiste de la wilaya de Annaba de 1976 à 1982, plan de lutte, résultats et recommandations. Develop Biol Standard 56: 727–735 [in French].

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

Communications orales et affichées dans le cadre du travail de thèse

Communications orales

LOUNES N., BOUYOUCEF A., LAZRI M., BENAMROUCHE N., TALI MAAMAR H., RAHAL KH.
Identification des souches de *Brucella* chez les bovins séropositifs dans la région de la Kabylie
5èmes Journées Vétérinaires de Blida
28 & 29 novembre 2015, Blida

LOUNES N., BENAMROUCHE N., TALI MAAMAR H., LAZRI M., RAHAL KH.
Situation de la brucellose animale en Algérie
Séminaire et atelier de formation sur la brucellose
Point sur la Brucellose : Epidémiologie, Diagnostic et Traitement
Institut Pasteur d'Algérie Dely Brahim
29 octobre 2015, Alger

LOUNES N., BOUYOUCEF A., LAZRI M, BENAMROUCHE N., RAHAL Kh., LE CARROU G., GARIN-BASTUJI B
Isolement et Identification phénotypique des *Brucella* chez les bovins en Algérie
Réunion de travail du comité des partenaires et des stagiaires
Projet AUF « Avortements infectieux chez les ruminants »
Sidi Thabet, le 20-21 septembre 2012, Tunisie

Communications affichées

LOUNES N., BOUYOUCEF A., LAZRI M., BENAMROUCHE N., RAHAL K., LE CARROU G., GARIN-BASTUJI B.
Brucella abortus isolated for the first time from the cattle livestock in central region of Algeria
Brucellosis 2014 International Research Conference
9–12 september 2014, Berlin

LOUNES N., CHERFA M-A., LE CARROU G., BOUYOUCEF A., JAY M., GARIN-BASTUJI B., MICK V.
Human brucellosis in Maghreb: Existence of a pre-independence lineage related to socio-historical connections between Algeria and France
Brucellosis 2014 International Research Conference
9–12 september 2014, Berlin

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche de Renseignements

Date : ……/……/……

Wilaya: ……

Abattoir :……

Nom du vétérinaire : ……..

Origine de l'animal :

Wilaya : ……..

Commune:……..

Numéro d'identification: ……..

Espèce: ☐ bovine ☐ caprine ☐ ovine ☐ cameline

Race:……

Sexe: ☐ mâle ☐ femelle.

Age:……

Type de prélèvements :

☐ lait ☐ ganglions rétropharyngiens ☐ ganglions mammaires ☐ autres

Si autres, précisez

……

L'animal a-t- il présenté des signes :

d'avortement : ☐ oui ☐ non

de non-délivrance : ☐ oui ☐ non

d'orchite ou épididymite : ☐ oui ☐ non

d'arthrite : ☐ oui ☐ non

Annexe 2

Protocole des prélèvements pour la recherche bactériologique des *Brucella*

Dr LOUNES Nedjma

Dés détection d'animaux brucelliques par dépistage, faire des prélèvements selon le protocole suivant :

I. Types de prélèvements :

- **Prélèvements de lait avant abattage :** chez les femelles séropositives.
- **Prélèvements des ganglions après abattage :**
- Chez les femelles : deux (2) ganglions lymphatiques **rétropharyngiens** et deux (2) ganglions lymphatiques **rétromammaires** (2).
- Chez les mâles : Deux (2)ganglions lymphatiques **rétropharyngiens.**

II. Méthodes de prélèvements :

➢ **Le lait :**

Matériel nécessaire:

- ✓ Eponge.
- ✓ Chiffon propre.
- ✓ Savon Marseille + Eau.
- ✓ Flacons stériles (60 ml).
- ✓ Etiquettes pour identification.
- ✓ Glacière + accumulateurs.
- ✓ Réfrigérateur+ congélateur.

Méthode de prélèvement de lait:

1) Se laver les mains soigneusement ;

2) Le lait doit être prélevé proprement : **il faut laver la mamelle** avec de l'eau et du savon en insistant sur le sphincter, puis essuyer avec un chiffon propre.

- ouvrir le flacon stérile en le tenant horizontalement,
- placer le bouchon dans le creux de la main, dans le même axe, de sorte de le protéger des pollutions ;
- le flacon, toujours tenu presque à l'horizontal et à l'écart de la vache ;

3) **Les deux premiers jets sont éliminés** et le prélèvement est effectué en direct dans un flacon stérile ;

➢ Commencer à traire les trayons à proximité du trayeur puis ceux en arrière ;

4) Il est nécessaire de prélever tous les quartiers ;

➢ Le flacon doit contenir le mélange des 4 quartiers (5ml pour chaque trayon),

- Il faut éviter tout contact entre le lait et les mains du trayeur (le jet de lait ne devant en aucun cas entrer en contact avec les mains du trayeur) ;
- reboucher le flacon sans mettre les doigts dans le bouchon ;

5) **le flacon de <u>prélèvement</u> doit être <u>identifié</u>** (cf identification du prélèvement plus bas) ;

- Il faut se laver et désinfecter les mains entre deux animaux à prélever.

6) **<u>Remplir la fiche de renseignements</u>**.

7) **<u>Transporter à +4°C dans une glacière, puis congeler jusqu'à leur expédition</u>**.

Pot pour le prélèvement de lait

Laver la mamelle

Insister sur le sphincter

Ouverture du pot à l'horizontal

Eliminer les 1ers jets et remplir le pot en prélevant le lait de tous les quartiers (20ml)

Fermer le pot et identifier le prélèvement

- **<u>Les ganglions lymphatiques</u> :**
  - Les prélèvements doivent être effectués de **<u>manière aseptique</u>** avec des instruments stériles.
  - **Des lames bistouri stériles** doivent être utilisés pour ce prélèvement et un soin particulier doit être porté pour éviter la contamination des prélèvements.
  - **Il faut prélever <u>02 ganglions rétro-pharyngiens</u> pour <u>les mâles</u>, et pour les <u>femelles</u> <u>02 ganglions rétro-pharyngiens + 02 ganglions rétro-mammaires</u>.**
  - Chaque type de ganglions doit être placée dans un flacon stérile séparé et parfaitement identifié.

Après la collecte, les ganglions doivent être réfrigérés jusqu'à leur expédition, le transport doit se faire dans une glacière à 4°C. Si l'expédition ne peut être faite sous 48h, les échantillons doivent être congelés.

Matériels nécessaires:

- ✓ Lames bistouri stériles.
- ✓ Flacons stériles (150 ml).
- ✓ Etiquettes pour identification.
- ✓ Glacière + accumulateurs.
- ✓ Réfrigérateur+ congélateur.

III. Acheminement et Conservation:

Si l'envoi des prélèvements ne peut être fait sous 48 h, les échantillons doivent être congelés. Leur expédition ou transport doit se faire dans une glacière à +4°C.

IV. Triple emballage :

Par mesure de sécurité les prélèvements doivent être mis en triple emballage, c'est à dire le prélèvement est mis dans un flacon stérile, puis tous les flacons de prélèvement doivent être mis dans une boite hermétiquement fermée, cette dernière déposée dans une glacière pour l'acheminement.

V. Mesures de sécurité nécessaires pendant les prélèvements :

La personne qui effectuera les prélèvements de lait ou des ganglions sur des animaux séropositifs devra prendre des précautions particulières. Elle devra porter des vêtements protecteurs : vêtements imperméables (type combinaison), bottes, des lunettes de sécurité, des gants jetables, masque (jetable). Elle devra avoir la possibilité de se désinfecter les mains (eau, savon, eau de Javel, désinfectants).

VI. Identification des prélèvements :

Les prélèvements doivent être identifiés, les informations suivantes doivent être mentionnées sur l'étiquette :

- N° d'identification de l'animal.
- Date du prélèvement (jour/ mois/ année).
- Espèce animale prélevée.
  Mentionner : **BV** pour bovin, **OV** pour ovin, **CP** pour caprin, **CML** pour camelin.
- Sexe de l'animal.
  Mentionner : ♀ pour femelle et ♂ pour mâle.
- Si prélèvement de ganglions :
  Mentionner : **Ph** pour rétropharyngien, **M** pour rétromammaire.

VII. Fiche de renseignements :

Les prélèvements doivent être obligatoirement accompagnés d'une fiche de renseignements qui doit impérativement être remplie en totalité.

Annexe 3

RECUEIL DE TEXTES REGLEMENTAIRES

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE

Arrêté interministériel du 26 Décembre 1995 fixant les mesures de prévention et de lutte spécifiques à la brucellose ovine et caprine.

- Le ministre de l'Intérieur, des collectivités locales, de l'environnement et de la Réforme administrative

- Le ministre des finances,

- Le ministre de la Santé et de la Population et

- Le ministre de l'Agriculture,

- Vu la loi n°88-08 du 26 janvier 1988 relative à la médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale

- Vu la loi n°90-08 du 07 avril 1990 relative à la commune ;

- Vu la loi n°90-09 du 07 avril 1990 relative à la wilaya ;

- Vu le décret présidentiel n°94-93 du 15 avril 1994, modifié et complété, portant nomination des membres du gouvernement ;

- Vu le décret exécutif n°88-252 du 31 décembre 1988, modifié et complété, fixant les conditions d'exercice à titre privé des activités de médecine vétérinaire et de chirurgie des animaux ;

- Vu le décret exécutif n°95-66 du 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables ;

- Vu l'arrêté interministériel du 1er septembre 1984 portant institution d'un comité national et de comités de wilaya de lutte contre les zoonoses ;

ARRETENT

Article 1er. - En application des dispositions defévrier 1995 sus l'article 3 du décret exécutif n°95-66 du 22 visé, le présent décret a pour objet de fixer les mesures de prévention et de lutte spécifiques à la brucellose ovine et caprine.

Art.2. - Tout animal de l'espèce ovine ou caprine qui avorte ou présente des symptômes prémonitoires d'un avortement ou consécutifs à un avortement est considéré comme suspect de brucellose .

Est considéré comme avortement :

- l'expulsion du foetus ,

- l'expulsion d'un mort né ou succombant dans les quarante huit (48) heures .

Toutefois, des épreuves sérologiques sur les multipares à l'occasion des mises-bas sont obligatoires .

Art.3. - Devant tout cas de suspicion de brucellose, le vétérinaire dûment mandaté est tenu d'effectuer les prélèvements nécessaires au diagnostic .

Il est entendu par prélèvements nécessaires :

* les fragments de placenta portant sur 2 ou 3 cotylédons et/ou un écouvillonage vaginal

* l'avorton ou les prélèvements requis sur un jeune mort-né .

* le colostrum ou le lait de la mère .

* du sang provenant des animaux suspects .

Le vétérinaire est tenu de rédiger un rapport sanitaire concernant les animaux suspects et l'exploitation, d'expédier les prélèvements dans les meilleurs délais accompagnés du rapport sanitaire et d'une fiche d'identification au laboratoire de diagnostic agréé par le ministère de l'agriculture .

Art. 4. - Dès la confirmation de la brucellose par le laboratoire agréé, une déclaration doit être faite à la Direction chargée de la santé publique de la wilaya qui est chargée de prendre les mesures sanitaires nécessaires chez l'homme au niveau de la zone infectée .

Art.5. - Sur proposition de l'inspecteur vétérinaire de wilaya, le wali déclare l'infection de l'exploitation .

Art.6. - Au niveau de l'exploitation infectée, le vétérinaire dûment mandaté doit prendre immédiatement les mesures suivantes :

- l'isolement, le recensement et l'identification de tous les animaux sensibles au niveau de l'exploitation.

- l'examen sérologique de tous les ovins et caprins âgés de plus de six (6) mois .

- la séquestration et le marquage des animaux réagissant positivement à la maladie par une perforation de l'oreille gauche à l'aide d'une pince emporte pièce (10 mm de diamètre) dans un délai de huit (8) jours suivant la notification officielle de la maladie .

- la mise en interdit des locaux, herbages et pâturages affectés à ces animaux .

Art.7. - La sortie des animaux de l'espèce caprine, ovine et bovine est interdite sauf pour l'abattage.

Dans ce cas, les animaux doivent être préalablement marqués et accompagnés d'un certificat d'abattage délivré par le vétérinaire dûment mandaté et dirigés directement sur un abattoir muni d'infrastructures permettant les abattages sanitaires .

Art.8. - Le lait produit dans l'exploitation ne peut être utilisé ou vendu, pour consommation en nature, qu'après ébullition .

Il ne peut être cédé que pour la fabrication de fromages subissant une maturation de plus de trois (3) mois et pour la fabrication, après pasteurisation, d'autres fromages ou tout autre produit dérivé .

Art.9. - L'ordre d'abattage des animaux atteints de brucellose peut être donné par le ministre chargé de l'agriculture ou par le wali dans le cadre d'un programme officiel et ce, sur proposition de l'autorité vétérinaire nationale .

Art.10. - Au cours de l'abattage, les personnes chargées de la saignée et de la préparation des viandes des animaux provenant de l'exploitation infectée, doivent porter pendant toute la durée des opérations d'abattage un bonnet, une blouse, un tablier et des gants en matière imperméable et lavable .

Art.11. - Une désinfection terminale de l'exploitation, après élimination des animaux marqués, et celle des véhicules servant au transport des animaux de l'exploitation est obligatoire et à la charge du propriétaire . Des certificats de désinfection sont délivrés par les services vétérinaires officiels .

Art.12. - Le wali, sur proposition de l'inspecteur vétérinaire de wilaya, lève la déclaration d'infection décrétée et ce, sous réserve que :

- tous les animaux marqués aient été éliminés .

- le contrôle sérologique effectué sur le reste du cheptel à intervalle de deux (2) mois au moins et six (06) mois au plus, après élimination des animaux atteints de brucellose, s'est avéré négatif à l'épreuve de l'antigène tamponné .

- une désinfection terminale ait été réalisée .

Art.13. - Le présent arrêté sera publié au *Journal Officiel* de la République algérienne démocratique et populaire .

Le ministre de l'Agriculture

Noureddine BAHBOUH

Le ministre de la santé et de la population

Yahia GUIDOUM

Le ministre de l'intérieur et des collectivités locales

Mostéfa BENMANSOUR

Le ministre de l'Economie

Le ministre Délégué au Trésor

Ahmed BENBITOUR

Annexe 4

RECUEIL DE TEXTES REGLEMENTAIRES

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE

Arrêté interministériel du 26 Décembre 1995 fixant les mesures de prévention et de lutte spécifiques à la brucellose bovine

- Le ministre de l'Intérieur, des collectivités locales, de l'environnement et de la Réforme administrative

- Le ministre des finances,

- Le ministre de la Santé et de la Population et

- Le ministre de l'Agriculture,

- Vu la loi n°88-08 du 26 janvier 1988 relative à la médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale

- Vu la loi n°90-08 du 07 avril 1990 relative à la commune ;

- Vu la loi n°90-09 du 07 avril 1990 relative à la wilaya ;

- Vu le décret présidentiel n°94-93 du 15 avril 1994, modifié et complété, portant nomination des membres du gouvernement ;

- Vu le décret exécutif n°88-252 du 31 décembre 1988, modifié et complété, fixant les conditions d'exercice à titre privé des activités de médecine vétérinaire et de chirurgie des animaux ;

- Vu le décret exécutif n°95-66 du 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables ;

- Vu l'arrêté interministériel du 1er septembre 1984 portant institution d'un comité national et de comités de wilaya de lutte contre les zoonoses ;

ARRETENT

Article 1er . - En application des dispositions de l'article 3 du décret exécutif n°95-66 du 22 février 1995 susvisé, le présent décret a pour objet de fixer les mesures de prévention et de lutte spécifiques à la brucellose bovine .

Art.2. - Tout animal de l'espèce bovine qui avorte ou présente des symptômes prémonitoires d'un avortement ou consécutifs à un avortement est considéré comme suspect de brucellose .

Est considéré comme avortement chez les femelles bovines .

- L'expulsion du foetus.

- L'expulsion du veau :

  * soit mort né

  * soit succombant dans les 48 h .

Art.3. - Toute personne ayant constaté un avortement ou les symptômes décrits à l'article 2 est tenue d'aviser immédiatement le vétérinaire de la circonscription concernée ou à défaut le Président de l'instance communale territorialement compétente, qui requiert le vétérinaire le plus proche.

Art. 4. - Le vétérinaire avisé doit se déplacer sur les lieux pour constater les faits . La femelle suspecte doit faire l'objet d'un isolement immédiat .

Une déclaration doit être faite au président de l'instance communale territorialement compétente .

Art. 5. - Si, au cours de l'examen de la femelle suspecte, le vétérinaire constate un avortement ou les traces d'un avortement éventuel , il est dans ce cas tenu :

- D'effectuer les prélèvements nécessaires au diagnostic .

On entend par prélèvements nécessaires :

* les fragments de placenta portant sur 2 ou 3 cotylédons lésés ou à défaut des sécrétions utérines ou l'avorton total ou son estomac ligaturé, ou sa rate ou son poumon .

* le sang provenant de la femelle suspecte d'avortement.

- De rédiger un rapport sanitaire concernant la femelle avortée et l'exploitation.

- D'expédier les prélèvements dans les meilleurs délais accompagnés du rapport sanitaire et d'une fiche d'identification au Laboratoire de diagnostic, agréé par le ministère de l'agriculture .

Art. 6. - Le laboratoire de diagnostic doit procéder rapidement à l'analyse des prélèvements et communiquer les résultats au vétérinaire expéditeur et à l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

Sont retenues comme épreuves de diagnostic :

* L'épreuve à l'antigène tamponné ,

* La réaction de fixation du complément,

* Le ring test ou test de l'anneau (lait)

* Toute autre épreuve autorisée par le ministère de l'agriculture.

Art. 7. - Sont reconnus indemnes, les animaux présentant à l'épreuve de fixation du complément un titre inférieur à 20 UI, sensibilisatrices par millilitre et provenant d'un cheptel indemne .

Art. 8. - Un cheptel est reconnu indemne si aucune manifestation clinique de brucellose n'a été notée depuis douze (12) mois au moins avec deux épreuves sérologiques négatives à l'antigène tamponné et pratiquées à un intervalle de six (6) mois sur tous les animaux de l'espèce bovine âgés de plus de douze (12) mois ou ayant un titre inférieur à vingt (20) unités sensibilisatrices à la réaction de fixation du complément .

Art.9. - Sont atteints de brucellose clinique :

* Les animaux ayant avortés avec une sérologie positive ou à partir desquels sont isolés les brucelles .

* Les animaux présentant une orchite avec examen sérologique positif .

Art.10. - Sont atteints de brucellose latente, les animaux qui présentent à l'examen sérologique un titre supérieur ou égal à vingt (20) unités sensibilisatrices par mililitre à la réaction de fixation du complément .

Art.11. - Dés que le foyer de brucellose est confirmé, l'inspecteur vétérinaire de wilaya en informe la Direction chargée de la santé publique au niveau de la wilaya qui prend les mesures sanitaires nécessaires chez l'homme au niveau de la zone infectée .

Art.12. - Le wali, sur proposition de l'inspecteur vétérinaire de wilaya, déclare l'infection de l'exploitation

Sont alors visées à l'égard des animaux de l'exploitation les mesures suivantes :

a) Visite et recensement des animaux d'espèces bovine, ovine et caprine et identification des bovins, ovins et caprins par le vétérinaire dûment mandaté par l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

b) Chaque bovin de plus de douze (12) mois d'âge doit subir un examen clinique et un prélèvement de sang pour le contrôle sérologique.

c) Isolement :

* des ou de la femelle avortée(s) ,

* des bovins reconnus atteints de brucellose clinique ou latente ,

* des parturientes (dès les signes prémonitoires de la mise-bas et jusqu'à disparition de tout écoulement vulvaire) .

d) Marquage obligatoire par le vétérinaire dûment mandaté :

* des ou de la femelle(s) avortée(s) dans les trois (3) jours qui suivent la communication du diagnostic par les services vétérinaires officiels, sur les lieux mêmes ou l'infection a été constatée .

* des bovins reconnus atteints de brucellose clinique ou latente (à la diligence du propriétaire ou du détenteur des animaux) dans les quinze (15) jours qui suivent la notification officielle de la maladie .

Ce marquage sera obligatoirement une perforation en 00 (20 mm de diamètre) de l'oreille gauche à l'aide de la pince « emporte pièce » .

Art.13. - L'exploitation concernée par l'arrêté portant déclaration d'infection est soumise à séquestration . La sortie des bovins, ovins et caprins est interdite sauf pour abattage. Dans ce cas , les animaux doivent être préalablement marqués .

L'accès de ces animaux à un pâturage commun et l'abreuvement aux points d'eau publics, rivières ou mares sont interdits .

Art.14. - L'accès aux locaux d'isolement est interdit à toute personne autre que le propriétaire, les employés chargés des soins aux animaux, et les agents des services vétérinaires dûment mandatés .

Art.15. - L'ordre d'abattage des animaux atteints de brucellose peut être donné par le ministre chargé de l'agriculture ou par le wali territorialement compétent dans le cadre d'un programme officiel et sur proposition de l'autorité vétérinaire nationale.

Il indique en outre, les conditions d'abattage des animaux dont les modalités sont décrites à l'article 16 ci-dessous .

Art.16. - Les animaux de l'exploitation infectée destinés à l'abattage sont obligatoirement accompagnés d'un certificat d'abattage individuel délivré par le vétérinaire dûment mandaté .

Ils seront transportés directement vers un abattoir agréé ou clos d'équarissage et ne doivent pas entrer en contact avec des animaux destinés à l'élevage .

Les personnes chargés de la saignée et de la préparation des viandes des animaux provenant de l'exploitation infectée, doivent porter pendant toute la durée des opérations d'abattage un bonnet, une blouse, un tablier et des gants en matière imperméable et lavable .

Art.17. - Une désinfection terminale de l'exploitation, après élimination des animaux marqués, et celles des véhicules servant au transport des animaux de l'exploitation est obligatoire et est à la charge du propriétaire .

Des certificats de désinfection sont, dans ce cas, délivrés par les services vétérinaires officiels.

Art.18. - Sur proposition de l'inspecteur vétérinaire de la wilaya, le wali lève la déclaration d'infection et ce, six (6) semaines au moins après la constatation du dernier cas de brucellose sous réserve que :

- tous les bovins marqués aient été éliminés,

- une désinfection terminale ait été réalisée .

Art.19. - Les mesures applicables après la levée de la déclaration d'infection .

- contrôle sérologique des animaux concernés dans un délai de deux (2) mois après abattage du dernier animal marqué et désinfection terminale .

- l'introduction de bovins dans le cheptel n'est possible qu'après un contrôle favorable des animaux concernés, et au minimum (douze) 12 mois après la levée de l'arrêté d'infection .

- l'isolement des parturientes est obligatoire pendant les douze (12) mois suivants la levée de l'arrêté d'infection

- le lait de vache ne peut être utilisé et vendu à l'état cru sauf à destination d'un atelier de pasteurisation ou après que l'exploitation soit reconnue indemne .

En cas d'usage sur place, il ne doit être utilisé qu'après ébullition .

Art.20. - Le présent arrêté sera publié au *Journal Officiel* de la République algérienne démocratique et populaire

Fait à Alger le26 décembre 1995 .

Le ministre de l'Agriculture

Noureddine BAHBOUH

Le ministre de la santé et de la population

Yahia GUIDOUM

Le ministre de l'intérieur et des collectivités locales

Mostéfa BENMANSOUR

Le ministre de l'Economie

Le ministre Délégué au Trésor

Annexe 5

Brucella table for alleles assignement [to convert alleles size (bp) into number of repeats (u)]

locus \ unit number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	28
Panel 1 (agarose2%)																										
bruce06-BRU1322_134bp_408bp_3u	140	274	**408**	542																						
bruce08-BRU1134_18bp_348bp_4u		312	330	**348**	366	384																				
bruce11-BRU211_63bp_257bp_2u		**257**	320	383		509		635	698			887		1013	1076											
bruce12-BRU73_15bp_392bp_13u							302	317	332	347	362	377	**392**	407	422	437	452									
bruce42-BRU424_125bp_539bp_4u	164	289	414	**539**	664	789	914																			
bruce43-BRU379_12bp_182bp_2u	170	**182**	194																							
bruce45-BRU233_18bp_151bp_3u		133	**151**	169	187																					
bruce55-BRU2066_40bp_273bp_3u	193	233	**273**	313	353	393	433			*553																
Panel 2A (agarose3%)																										
bruce18-BRU339_8bp_146bp_5u			130	138	**146**	154	162	170	178	*186																
bruce19-Bru324_6bp_163bp_18u				79	85	91												**163**	169	175	181	187	193		205	
bruce21-BRU329_8bp_148bp_6u					140	**148**	156	164	172																	
Panel 2B (agarose3%)																										
bruce04-BRU1543_8bp_152bp_2u	144	**152**	160	168	176	184	192	200	208	216	224	232	240	248	256	264	272	280	288	296	304	312	320			360
bruce07-BRU1250_8bp_158bp_5u		134	142	150	**158**	166	174	182	190	198	206	214	222	230		246										
bruce09-BRU588_8bp_156bp_7u			124	132	140	148	156	**164***	172	180	188	196	204	212	220	228	236	244	252	260	268	276	284	292		
bruce16-BRU548_8bp_152bp_3u		144	**152**	160	168	176	184	192	200	208	216	224	*232	240	248	**254		**270								
bruce30-BRU1505_8bp_151bp_6u		119	127	135	143	**151**	159	167	175	183	191	199														

*** not expected size in available 16M reference strain**

Le Flèche et al. 2006 version 3.3 (last modified june 2nd 2009)

** Alleles observed in B. microti isolates*

*** Alleles observed in B. ceti isolates*

Annexe 6

Composition du Milieu Farrell

Composants	Quantité pour 1 L
Blood Agar Base N°2	40 g
Eau ultra pure	1000 ml
Sérum de cheval stérile	50 ml
Supplément sélectif pour *Brucella*	
Polymyxine B sulfate	5 mg
Bacitracine	25 mg
Natamycine	50 mg
Acide nalidixique	5 mg
Nystatine	100 mg
Vancomycine	20 mg

Annexe 7

Liste des prélèvements testés en PCR-TR

N° animal	N° Prélèvement	Type de prélèvement	Résultats bactériologie	Résultats PCR
1	04/G M	GM	P	P
	04/G Ph	GPh	N	N
2	05/G M	GM	N	N
	05/G Ph	GPh	N	N
3	06/G M	GM	P	P
4	07/G Ph	GPh	N	D
5	08/G Ph	G Ph	N	N
	08/G M	GM	N	N
6	09/G M	GM	P	D
	09/G Ph	GPh	N	N
7	10/G Ph	GPh	N	D
	10/G M	GM	N	P
8	11/G M	GM	P	P
	11/G Ph	G Ph	P	N
9	12/G Ph	G Ph	P	P
	12/G M	GM	P	P
10	13/G Ph	GPh	P	N
	13/G M	GM	P	N
11	14/G Ph	GPh	N	D
12	15/G Ph	GPh	N	N
13	16/G M	GM	N	N
	16/G Ph	GPh	N	D
14	17/G M	GM	N	D
	17/G Ph	GPh	N	D
15	18/G M	GM	N	P
16	19/G M	GM	N	P
	19/G Ph	GPh	P	P
17	20/G M	GM	N	P
	20/G Ph	G Ph	P	P
18	21/G M	GM	N	D
	21/G Ph	GPh	P	P
19	22/G Ph	GPh	N	P
	22/G M	GM	P	P
20	23/G Ph	GPh	N	P
	23/G M	GM	N	P

21	24/G Ph	G Ph	N	P
	24/G M	GM	N	D
22	25/G M	GM	P	P
	25/G Ph	G Ph	N	P
23	26/G M	GM	P	P
	26/G Ph	GPh	P	P
24	27/G M	GM	P	P
	27/G Ph	GPh	N	N
25	31/G M	GM	N	P
	31/G Ph	GPh	N	P
26	32/G Ph	GPh	N	D
27	33/G Ph	GPh	N	P
28	36/G M	GM	P	P
	36/G Ph	GPh	P	N
29	37/G M	GM	P	N
30	38/G Ph	GPh	P	N
31	39/G Ph	GPh	N	N
32	40/G M	GM	N	N
33	41/G M	GM	N	P
	41/G Ph	GPh	N	P
34	42/G Ph	GPh	P	N
35	53/ GM	GM	P	N
	53/Gph	GPh	N	I
36	54//Gph	GPh	N	N
	54/GM	GM	P	P
37	55/GM	GM	N	N
	55/Gph	G Ph	P	D
38	59/GM	GM	P	D
	59/Gph	GPh	N	N
39	60/Gph	GPh	N	N
	60/GM	GM	N	N
40	61/GM	GM	P	P
	61/Gph	G Ph	P	P
41	62/Gph	G Ph	N	N
	62/GM	GM	N	D
42	63/Gph	G Ph	N	N
	63/GM	GM	N	N
43	75/GM	GM	N	N
	75/Gph	GPh	N	N
44	76/Gph	GPh	N	N
	76/GM	GM	N	N
45	77/Gph	GPh	N	N
	77/GM	GM	N	N

46	78/GM	GM	N	D
	78/Gph	GPh	N	N
47	79/GM	GM	P	N
	79/Gph	GPh	N	N
48	80/Gph	GPh	N	N
	80/GM	GM	N	P

GPh: ganglions rétro-pharyngien

GM: ganglion rétro-mammaire

P: positif

N: négatif

I: inhibition

D: douteux