

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE -ALGER

المدرسة الوطنية للبيطرة - الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PREVALENCE

DE LA NEOSPOROSE BOVINE DANS L'ALGEROIS

Présenté par : Karine ACHOUR

Soutenu le : 25 juin 2008

Jury :

- Présidente : Melle AIT AOU DHIA .K (C.C)
- Promotrice : Melle BEN-MAHDI M.H (M.C)
- Examinatrice : Melle GHALMI. F (C.C)
- Examinatrice : Mme HANI. A (C.C)
- Examinatrice : Mme REMICHI. H (C.C)

Année universitaire : 2007/2008

DEDICACES

A la mémoire de mes deux grands pères paternel et maternel

A mes adorables parents qui ont toujours été là pour moi, pour leur soutien et leur confiance.

A ma petite sœur Yasmine et mon petit frère Amine

A mes deux grand-mères paternelle et maternelle

A tous mes oncles et tantes

A tous mes cousins et cousines

A tous mes amis plus particulièrement : Rafik, Nasime, Kahina, Sabrina, Fatima et Madjid

A tous ceux que j'aime.

REMERCIEMENTS

A Mademoiselle le Docteur AIT A OUDHIA,
En acceptant de présider notre jury, vous me faites un immense honneur.
Soyez ici très humblement remercié.

A Mademoiselle le Docteur B E N MAHDI,
Vous n'avez ménagé ni votre temps ni vos efforts pour m'encadrer dans l'élaboration de ce mémoire.
J'espère être à la hauteur de vos attentes.
Mon admiration et ma reconnaissance vous sont assurées.

A Madame le Docteur H A N I,
Votre enseignement est un modèle: je suis fier de vous compter parmi les membres de mon jury.

A Mademoiselle le Docteur G H A L M I,
J'ai toujours suivi votre enseignement avec beaucoup d'intérêt. Vous avoir comme membre de mon jury m'honore.
Je vous en remercie vivement.

A Madame le Docteur R E M I C H I,
Vous avez toujours été là pour me guider durant mes cliniques de canine.
La qualité de votre enseignement m'a marqué.
Soyez remerciée pour votre sollicitude.

A Madame le Docteur T E N I O U
Vous m'avez ouvert les portes de votre laboratoire avec beaucoup de gentillesse et de disponibilité.
Ma reconnaissance vous est définitivement acquise

ABBREVIATIONS

BVD /MD :	bovine virus diarrhoea / maladie des muqueuses
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
IB :	immunoblot
IBR:	infectious bovine rhinotracheitis
IFI :	immunofluorescence indirecte
IgA:	immunoglobuline A
IgG :	immunoglobuline G
PCR :	polymerase chain reaction
Pb :	paire de base

SOMMAIRE

Introduction	1
<i>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	
I. Etiopathogénie	2
1. Etude du parasite	2
1.1 Taxonomie.....	2
1.2 Description de <i>Neospora caninum</i>	2
1.2.1 Tachyzoïte.....	3
1.2.2 Kystes a bradyzoïtes.....	4
1.2.3 Ookystes.....	4
2. Cycle évolutif	5
2.1 Hôte définitif.....	5
2.2 Hôte intermédiaire	5
3. Pathogénie de la transmission	6
II. Aspects épidémiologiques.....	7
III. Conséquences cliniques et économiques.....	8
IV. Diagnostic	9
1. Diagnostic épidémioclinique.....	9
2. Diagnostic différentiel	10
3. Diagnostic de laboratoire	11
3.1 Histopathologie	11
3.2 Immunohistochimie.....	12
3.3 Tests sérologiques.....	12
3.3.1 La méthode d'agglutination directe	12
3.3.2 Le test immunofluorescence indirecte (IFI)	13
3.3.3 Le test ELISA	13
3.4 La PCR.....	14
V. Traitement.....	15
VI. Méthode de lutte et prophylaxie médicale.....	15

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Objectif	16
II. Matériels et méthodes	16
1. Caractéristiques des populations bovines testées	16
2. Matériel expérimental utilisé	16
2.1 Kit ELISA.....	16
2.1.1 Description et principe du test	17
2.2.1 Mode opératoire.....	20
2.2 Test d'immunofluorescence indirecte.....	20
2.2.1 Description et principe du test	20
2.2.2 Production de Tachyzoïtes	20
2.2.3 Purification des Tachyzoïtes	21
III. Résultats.....	24
IV. Discussion et Conclusion.....	27

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

FIGURE 1 :FORME TACHYZOITES DE <i>N .CANINUM</i>	3
FIGURE2 :FORMES BRADYZOITES DE <i>N.CANINUM</i>	4
FIGURE 3 : PRINCIPALES VOIES DE CCONTAMINATION PAR <i>NEOSPORA</i> <i>CANINUM</i>	5
FIGURE 4 :CHIEN PARTAGEANT L'ALIMENTATION DE BOVINS.....	7
FIGURE 5 :AVORTON	9
FIGURES 6 : PRELEVEMENT DE COTYLEDONS.....	9
FIGURE 7 : LESION HISTOLOGIQUES ASSOCIEE A L' <i>INFECTION</i>	11
FIGURE 8 :AMAS DE TACHYZOITES MIS EN EVIDENCE APRES COLORATION AU MAY GRUNWALD GIEMSA GROSISSEMENT X 40	12
FIGURE 9 :MISE EN EVIDENCE PAR PCR DE <i>N.CANINUM</i> DANS LE CERVEAU D'UN AVORTON.....	14
FIGURE 10 :PLAQUE ELISA APRES REVELATION	18

PARTIE EXPERIMENTALE

FIGURE 1 : RESULTATS EXPRIMES EN POURCENTAGES DU SERODIAGNOSTIC PAR ELISA.....	24
FIGURE 2 : RESULTATS DU SERODIAGNOSTIC ELISA VIS-A-VIS DE <i>N.CANINUM</i> PAR WILAYA...25	
FIGURE 3 : FLUORESCENCE GLOBALE OBSERVEE DANS LE CAS D'UN SERUM POSITI SUR TAPIS CELLULAIRE DE CELLULE VERO INFECTTEE AVEC LA SOUCHE NC-1 DE <i>N</i> <i>CANINUM</i>	25
FIGURE 4 : RESULTATS POSITIFS OBTENUS EN IFI.....	26

TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

TABLEAU I : DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DES AVORTEMENTS.....	10
---	----

PARTIE EXPERIMENTALE

TABLEAU I : Résultats du sérologie par ELISA sur 186 prélèvements testés	23
TABLEAU II : Résultats du test IFI sur les sérums révélés positifs ou douteux en ELISA.....	26

INTRODUCTION

La néosporose est une maladie parasitaire, décrite pour la première fois en Norvège par Bjerkas et al, en 1984. Un protozoaire, morphologiquement similaire à *Toxoplasma Gondii*, a été mis en évidence au niveau de lésions musculaires et nerveuses de chiots boxer atteints de troubles neurologiques, sans détection d'anticorps sériques spécifiques de *Toxoplasma Gondii* (**Andrinarivo et al., 1999**).

En 1988, Dubey et al, réussirent à isoler un protozoaire sur culture cellulaire et sur souris inoculées à partir de chiens atteints de pneumonie, de dermatite et de myosite. Ce protozoaire qui se distinguait sur le plan ultra-structural et le plan antigénique de *Toxoplasma gondii* fut dénommé *Neospora caninum* (**Dubey & Lindsay, 1996**).

Ce n'est qu'au début des années quatre-vingt dix, que ce parasite est réellement reconnu comme pouvant constituer une entité pathologique à part entière, responsable d'avortements chez les bovins. Après notamment la mise en évidence de sa présence dans le cerveau d'avortons bovins (**Dubey et al. ,1992**). Par la suite, de nombreuses publications font état de la présence de cette nouvelle pathologie dans de nombreux pays (**Hassig & Gottstein, 1992**)

La situation épidémiologique en Algérie concernant cette parasitose, est pour le moment pratiquement inconnue, n'ayant fait l'objet que de très peu de travaux. Notre étude expérimentale a eu comme objectif l'étude de la prévalence de la néosporose bovine dans la région centre de l'Algérie.

Dans une première étape, un sondage sérologique a été réalisé dans la région centre du pays, dans des exploitations dans lesquelles des avortements bovins ont été signalés et pour lesquelles des analyses sérologiques pour la recherche de la brucellose ont été négatives.

Dans une seconde étape, les sérologies trouvées positives en ELISA néosporose ont été confirmées par une méthode de référence : le test d'immunofluorescence indirect. Ce dernier test nous a permis de quantifier les titres anticorps obtenus et de rapporter éventuellement cette sérologie positive à un épisode abortif du à *Neospora Caninum*.

I. ETIOPATHOGENIE

1. ETUDE DU PARASITE

Néospora caninum est un parasite du groupe des *Apicomplexa*, responsable d'avortements chez les bovins. Il a un cycle de développement comprenant un ou plusieurs hôtes définitifs et de nombreux hôtes intermédiaires (*Dubey & Lindsay, 1996 ; Chermette & Marquer, 2000*).

1.1. TAXONOMIE

Neospora caninum appartient à la famille des Sarcocystidae et partage une grande parenté avec *T. gondii* dans le phylum des *Apicomplexa* (*Ellis et al., 1994*).

Un nouveau membre isolé du cerveau d'un cheval adulte est venu enrichir en 1996, le genre Néospora : il s'agit de *N. hughesi* (*Marsh et al., 1996*)

Embranchement	Apicomplexa
Classe	Sporozoa
Sous classe	Coccidia
Ordre	Eucoccidia
Famille	Sarcocystidae
Genre	Néospora
Espèce	<i>N.caninum</i> et <i>N. hughesi</i>

(*Ellis et al ., 1994*)

1.2. DESCRIPTION DE *N. CANINUM*

Ce parasite peut être retrouvé sous 3 formes différentes :

- ***Les tachyzoïtes*** qui sont ses formes de dissémination du parasite à l'intérieur de l'organisme parasité.
- ***Les bradyzoïtes*** qui sont ses formes de résistance ou de latence, rencontrées sous forme de kystes intracellulaires, notamment dans les tissus nerveux.
- ***Les ookystes*** qui représentent ses formes infestantes.

1.2.1. Tachyzoïtes

De forme plus ou moins ovoïde, ils mesurent entre 3 et 7 μm de long et entre 1 et 5 μm de large. Les tachyzoïtes sont présents chez les animaux infectés dans les cellules du système nerveux, dans les macrophages, les lymphocytes, les cellules de l'endothélium vasculaire, les cellules musculaires et les hépatocytes (*Brugère-Picoux et al., 1996*).

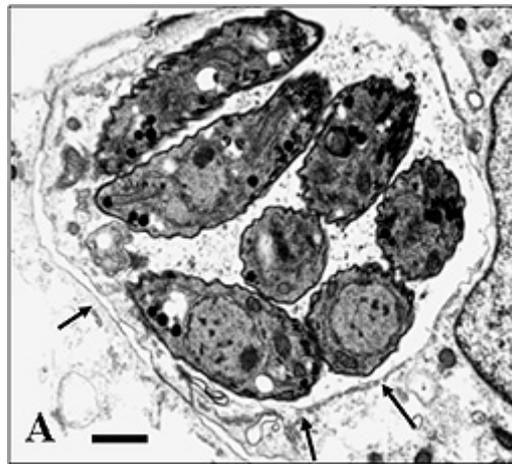


Figure 1: Forme tachyzoïtes de *N. caninum* –Microscopie électronique (<http://www.forschung3r.ch>)

Les tachyzoïtes se retrouvent dans le cytoplasme des cellules infectées, ou ils sont parfois contenus dans une vacuole parasitophore (figure 1). Il est souvent difficile de les différencier d'un kyste tissulaire contenant des bradyzoïtes.

Le complexe apical du parasite, semble jouer un rôle important dans l'attachement et la pénétration du parasite dans la cellule hôte, il est composé de 22 microtubules sous membranaires, de 2 anneaux apicaux, d'une conoïde, de plus de 150 micronèmes et entre 8 et 18 rhoptries. Ces rhoptries sont denses aux électrons et permettent de différencier en microscopie électronique *Neospora caninum* de *Toxoplasma gondii*.

1.2.2. Kystes à bradyzoïtes

Ce sont des kystes tissulaires, intracellulaires, de forme ovale, qui ne sont retrouvés que dans les tissus nerveux du cerveau, de la moelle épinière et de la rétine. Ces kystes peuvent contenir jusqu'à 200 bradyzoïtes (figure 2).

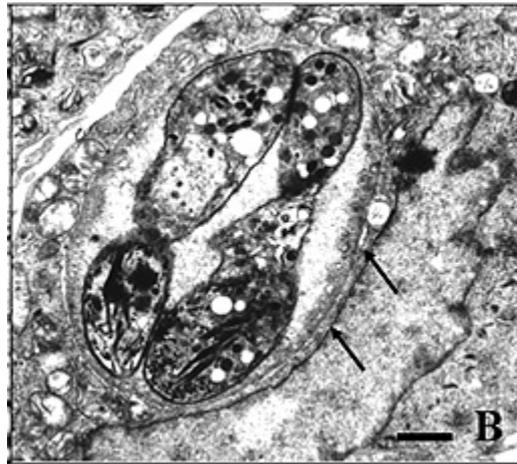


Figure 2: Formes bradyzoïtes de *N. caninum* –Microscopie électronique (<http://www.forschung3r.ch>)

Les kystes tissulaires sont détruits par la congélation à -20°C durant 24 heures. Mais les bradyzoïtes contenus dans ces kystes sont résistants à la pepsine, ce qui rend possible l'infestation de l'hôte définitif carnivore par ingestion.

1.2.3. Ookystes

Ce sont des éléments de forme arrondie mesurant $10 \times 11 \mu\text{m}$. Ils sont émis sporulés par l'hôte définitif dans le milieu extérieur. Après sporulation, l'ookyste contient deux sporocystes avec chacun quatre sporozoïtes.

2. CYCLE EVOLUTIF DU PARASITE

Le cycle parasitaire de *N. caninum* est de type coccidien. Ce cycle pour qu'il soit complet nécessite deux hôtes : un hôte définitif et un hôte intermédiaire, chez qui l'on retrouve les différents stades de développement du parasite (figure 3).

2.1. HOTE DEFINITIF

L'hôte définitif (habituellement le chien), s'infeste en ingérant des tissus provenant d'hôtes intermédiaires contenant des bradyzoïtes inclus dans des kystes tissulaires. Les parasites subissent dans l'appareil digestif de l'hôte définitif tout d'abord une multiplication asexuée puis une reproduction sexuée. Aboutissant 5 à 8 jours après l'infestation et durant environ 10 jours au rejet dans les fèces d'oocystes non sporulés (*Dijkstra et al ., 2002*). Les oocystes libérés dans le milieu extérieur sporulent en 24 heures environ, devenant alors les formes capables de contaminer les hôtes intermédiaires.

D'autres espèces de carnivores sauvages telles que le renard et le chacal notamment, sont suspectées de pouvoir jouer un rôle d'hôte définitif, au même titre que le chien.

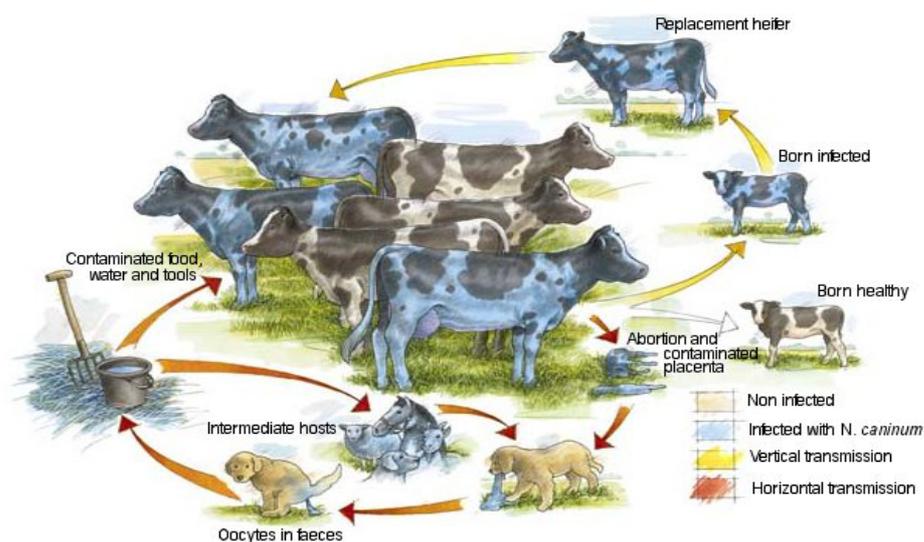


Figure 3 : Principales voies de contamination par *Neospora caninum* dans les élevages bovins (d'après Mc Allister, 2000)

2.2. HOTE INTERMEDIAIRE

De nombreuses espèces animales peuvent jouer ce rôle d'hôte intermédiaire comme les bovins, les ovins, les caprins, les chevaux, les cervidés, les chiens et les renards.

L'hôte intermédiaire après ingestion des oocystes sporulés va développer une infection systémique. En effet à partir des oocystes ingérés, vont être libérés des sporozoaires infectieux qui vont pénétrer dans les cellules de l'hôte et se transformer en tachyzoïtes.

Les tachyzoïtes se multiplient rapidement par endodyogénie dans de nombreux tissus et organes, tels que les muscles, le foie, le cœur, les poumons, le placenta et les nerfs, produisant en quelques jours plusieurs centaines de nouveaux parasites. Certains d'entre eux vont se transformer en bradyzoïtes et permettre ainsi au parasite de rester en latence sous forme de kystes tissulaires au niveau du cerveau. Ces kystes tissulaires peuvent persister plusieurs années chez l'hôte infecté sans entraîner de signes cliniques (*Dubey & Lindsay, 1996*).

3. PATHOGENIE DE LA TRANSMISSION

La transmission transplacentaire de *N. caninum* de la mère au veau, est la voie principale d'infestation chez les bovins, l'infection horizontale ou postnatale ne jouant qu'un rôle minime (*Bergeron et al., 2001*). L'infection peut ainsi se transmettre verticalement sur plusieurs générations, cependant tous les animaux infectés ne contamineront pas forcément leur descendance (*Bjorkman et al., 1996*).

II. ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES

N. caninum a été mis en évidence dans tous les pays où il a été recherché. Sa répartition est mondiale. La proportion des cheptels infectés varie d'un pays à l'autre, elle varie de 50% au Danemark à 94% en Espagne (*Bourdoiseau, 2000*).

La séroprévalence individuelle varie également en fonction des pays, elle oscille entre 7% en France

Et 30% au Canada (*Klein et al., 1997, Pare et al., 1998*).

Facteurs de risques

- Présence de chiens : le chien a été identifié comme l'hôte définitif de *N. caninum*.

Certaines études ont montré que la présence du chien dans une ferme constituait un facteur de risque. Cependant, il n'est établi formellement que les épisodes d'avortement sont tous dus à la contamination des bovins par des ookystes émis dans les fèces des chiens, l'infection pouvant être maintenue par transmission verticale pendant plusieurs années (*Wouda et al., 1998*).



Figure 4 : Chien partageant l'aliment des bovins

- Autres espèces potentiellement hôtes définitifs : d'autres canidés tels que le coyote, le renard, pourraient entretenir le cycle sauvage du parasite (*Barling et al., 2000*).
- Immunodépression : des mycotoxicooses peuvent être à l'origine d'immunodépression suite à l'ingestion d'ensilage de maïs moisi (*Bartels et al., 1999*).

- Ingestion de colostrum par les veaux : les travaux d'Uggla et al, ont montré que les veaux pouvaient être contaminés par ingestion de colostrum contenant des tachyzoïtes (Uggla et al., 1998).

III. CONSEQUENCES CLINIQUES ET ECONOMIQUES

N. caninum est à l'origine essentiellement chez les bovins d'avortements apyrétiques, sans rétention placentaire ou retours de chaleur prématurés. Les avortements ont lieu surtout entre le 4^e et 7^e mois de gestation (Dubey, 1999). La momification est un signe clinique important qui doit toujours faire penser à la possibilité d'un avortement à *N. caninum* (Thurmond & Hietala, 1996).

L'infection par *N. caninum* peut aussi entraîner la naissance de veaux vivants, mais présentant des signes neuromusculaires, ceux ci apparaissant en général 3 à 5 jours après la naissance (Marquer & Chermette, 2000).

Dans la majeure partie des cas, l'infection à *N. caninum* aura pour conséquence de donner lieu à la naissance de veaux normaux cliniquement, mais infectés chroniquement et donc porteurs sains de ce parasite, qu'ils pourront ainsi, dans la majeure partie des cas transmettre à leur descendance par voie trans-utérine (Pan et al., 2004).

Il n'y a pas pour le moment, de données très précises relatives aux pertes économiques engendrées par la néosporose dans le monde. On estime tout de même que 20 à 30% des avortements chez les bovins sont dus à *Neospora caninum* (Dubey, 1999).

IV. DIAGNOSTIC

1. DIAGNOSTIC EPIDEMIO-CLINIQUE

La survenue d'avortements sporadiques ou épizootiques, survenant entre 4 et 7 mois de gestation, sans aucun signe clinique associée, si ce n'est des paralysies neuromusculaires sur des veaux, devrait conduire à envisager la présence possible d'un avortement à *N. caninum*. La confirmation d'une infection à *N. caninum* passant obligatoirement par l'établissement d'un diagnostic de laboratoire positif.



Figure 6 : Prélèvement de cotylédons (Photo personnelle)



Figure 5 : Avorton (Photo personnelle)

2. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

La néosporose s'inscrit dans le cadre du diagnostic différentiel des avortements bovins d'une part et, plus rarement dans le cas du diagnostic différentiel des affections nerveuses et /ou locomotrices du veau (*Marquer & Chermette, 2000*).

Tableau I : Diagnostic différentiel des avortements (*Marquer & Chermette, 2000*)

AVORTEMENTS	AFFECTIONS NERVEUSE/LOCOMOTRICES
Causes infectieuses	
Brucellose	Coccidioses à <i>Eimeria sp.</i>
Salmonellose	Sarcosporidiose
Chlamydiose	Rage
Fièvre Q	Maladies d'Aujeszky
Listériose	Listériose
Mycoses	Méningites
Leptospirose	Colibacillose
IBR, BVD/MC	Salmonelloses
Trichomonose	Autres
Campylobactériose	
Autres(E .Coli, ...)	
Causes non infectieuses	
Génétique	Malformation nerveuse congénitale
Nutritionnelle	Déséquilibre hydro-électrolytique
Iatrogène	Carences en vitamines du groupe B
Autres	

3. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

Le diagnostic de certitude d'un avortement suspecté d'être dû à *Neospora caninum*, repose sur l'examen des tissus fœtaux et des sérums maternel et fœtal.

3.1. HISTOPATHOLOGIE

La néosporose bovine est caractérisée par la présence d'une encéphalomyélite associée à des foyers de nécrose. Ces foyers de nécrose sont entourés d'une zone d'infiltration péri-vasculaire de cellules mononuclées (*Brugere-Picoux et al., 1996*) (figure 7). Ces mêmes lésions sont également retrouvées dans d'autres organes tels que le cœur, le foie...

Cette technique de diagnostic reste l'apanage des histologistes expérimentés, vu le très petit nombre de kystes bradyzoïtes et de tachyzoïtes retrouvés souvent morts dans les prélèvements.

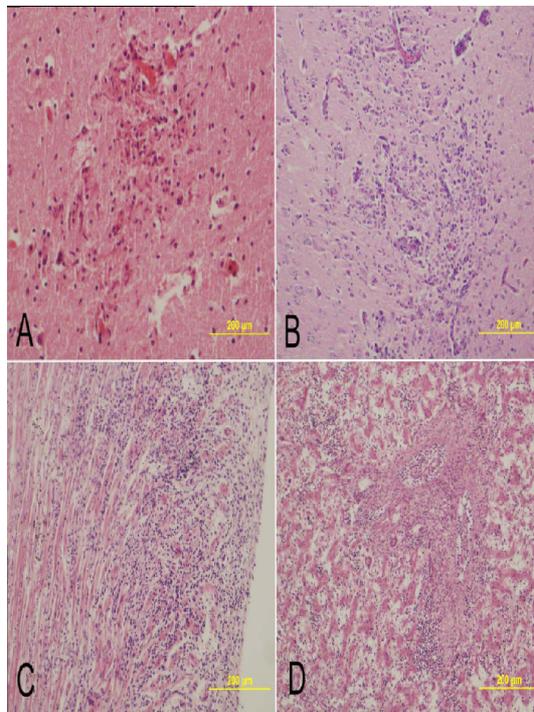


Figure 7: Lésions histologique associées à l'infection à *N.caninum*

(Coloration à l'hématoxyline-éosine)

A : Nécrose focale et infiltration monocellulaire retrouvées dans le cerveau d'un fœtus infecté

B : Gliose et infiltration monocellulaire retrouvées chez un veau de 3 jours.

C & D : Atteintes cardiaque et hépatique

3.2. IMMUNOHISTOCHEMIE

Cette méthode utilise des anticorps spécifiques qui permettent de détecter les tachyzoïtes et les kystes à bradyzoïtes et de différencier plus facilement les kystes de *Neospora caninum* de ceux des autres sporozoaires bovins (figure 8).

Bien que ce test soit considéré comme très spécifique, de nombreux auteurs conseillent de le coupler à des examens sérologiques pour interpréter les résultats obtenus.

Il présente en outre l'avantage de rester assez performant sur des coupes de cerveaux fœtaux momifiés ou légèrement autolysés.



Figure 8: Amas de tachyzoïtes mis en évidence après coloration au May Grunwald Giemsa
Grosissement X 40 (Photo personnelle)

3.3. TESTS SEROLOGIQUES

3.3.1. La méthode d'agglutination directe

Ce test est basé sur l'agglutination directe de tachyzoïtes entiers traités au formol par des anticorps spécifiques de *Neospora caninum*, contenus dans les sérums à tester. La présence d'anticorps spécifiques se traduit par la formation d'une agglutination parasitaire en voile, macroscopiquement visible.) (*Packham et al ., 1998*).

3.3.2. Le test d'immunofluorescence indirecte (IFI)

Première technique mise au point pour détectant les anticorps à *N. caninum*, l'IFI est considérée comme la méthode sérologique de référence. Elle permet de détecter des anticorps spécifiques dès le 7^e jour post infection et ensuite pendant plusieurs mois.

Les anticorps dirigés contre *N. caninum* sont détectés par fluorescence après fixation sur des antigènes de surface de tachyzoïtes (produits sur culture cellulaire et fixés sur une lame).

Le test est considéré comme positif, si on observe au niveau des tachyzoïtes une fluorescence périphérique vive et continue. De nombreux auteurs considèrent comme significatif d'un avortement un titre de 1/640 pour les adultes et de 1/80 pour les *fœtus* (*Dubey, 1988 ; Pare et al ., 1998*).

Cette technique requiert néanmoins un œil averti et expérimenté.

3.3.3. Le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Les tests ELISA actuellement employés utilisent surtout des antigènes membranaires de surface du parasite ou des protéines recombinantes, en effet l'utilisation de tachyzoïtes entiers ou d'antigènes somatiques ont donné lieu à des réactions croisées avec d'autres sporozoaires (*Harrkins et al .,1998 ; Howe et al .,2002 ; Liu 2007*).

Les tests ELISA présentent l'avantage par rapport à l'immunofluorescence de permettre de traiter un grand nombre de sérums en même temps ce qui justifie l'utilisation de ce test dans des études de screening séro-épidémiologique. Les valeurs seuils de lecture, sont déterminées à l'aide de sérums dits de référence ou de contrôle. Ces derniers sont d'ailleurs souvent caractérisés par immunofluorescence et la valeur de leurs titres sont lues sur un spectrophotomètre permettent de définir la nature positive, négative ou douteuse d'un sérum (*Williams, 1994*).

En revanche, il n'est pas recommandé de traiter les sérums de fœtus en ELISA pour diagnostiquer un avortement à *N. caninum*, les résultats obtenus n'étant pas suffisamment discriminatoires (*Wouda, 1997*), les techniques de diagnostic directes seront préférées dans cette situation.

3.4. LA PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Cette méthode, plus sensible que l'immuno-histochimie permet de détecter la présence du parasite dans différents tissus nerveux. Elle est basée sur l'amplification de fragments d'ADN extraits de tissus fœtaux, comme le cerveau et le cœur. Les amorces le plus souvent utilisées pour l'amplification de l'ADN de *N. caninum* ciblent la séquence Nc5 (figure 9) (*Collantes-Fernandez et al ., 2002 ; Bazler et al ., 1999*).

Hautement spécifique, cette technique offre l'avantage de ne présenter aucune réaction croisée avec *T.gondii* contrairement aux autres méthodes.

L'inconvénient majeur freinant son application en routine reste son coût élevé et la diminution de sa sensibilité sur des prélèvements dégradés comme les c'est le cas fréquemment des avortons. Elle est développée avec succès dans le diagnostic de la néosporose canine ainsi que pour la recherche des ookystes dans les fèces (*Ghalmi et al, 2008 ; Lally et al, 1996*)

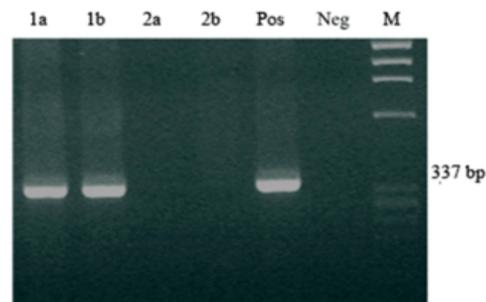


Figure 9 : Mise en évidence par PCR de *N.caninum* dans le cerveau d'un avorton (amplification du fragment Nc5).

Pos: contrôle positif, Neg: blanc PCR. M: Marqueur de poids moléculaire (Hae III).

Immunoblot

Difficilement utilisable en tant qu'outil de screening, ce test est le plus souvent utilisé en association avec d'autres tests diagnostic. Il permet notamment la mise en évidence des antigènes immunodominants.

*NB : l'isolement de *N. caninum* sur culture cellulaire reste d'un apport limité dans le diagnostic.*

TRAITEMENT

Seuls les tachyzoïtes pourraient constituer une cible pharmacologique potentielle, les kystes à bradyzoïtes et les ookystes étant insensibles à un éventuel traitement médicamenteux. Toutefois, dans l'immédiat aucun traitement ne peut être proposé pour lutter contre la néosporose bovine. En effet, malgré l'efficacité de certains antibiotiques ionophores (lasalocid, monensin, narasine...), macrolides (azithromycine, érythromycine clarithromycine) ou certains anti-amibiens comme le toltrazuril, le ponazuril *in vitro* sur *N. caninum*, leur utilisation dans la thérapeutique de la néosporose bovine ne paraît pas économiquement possible à l'heure actuelle. Enfin le décoquinat incorporé en tant qu'aliment médicamenteux permettrait de diminuer le taux d'avortement et réduirait la transmission verticale.

VI. METHODES DE LUTTE ET PROPHYLAXIE MEDICALE

Elle passe en tout premier lieu par une limitation de la transmission horizontale, pour cela il faut s'assurer que l'eau et la nourriture destinées au bétail ne puissent pas être contaminées par des excréments d'animaux domestiques ou sauvages. L'interdiction de l'accès aux canidés de l'exploitation aux réserves d'eau et d'aliments de l'exploitation s'impose dès lors. Tous les avortons et les placentas potentiellement infectants doivent être incinérés ou détruits, aucune transmission à un hôte définitif ne doit demeurer possible.

La lutte contre la transmission verticale passe par la réforme des animaux à sérologie positive, mais au vu du fort taux de prévalence dans la plupart des troupeaux, cela paraît économiquement rarement envisageable. Toutefois cette approche devra être recommandée en cas de prévalence faible (*Parre et al., 1998*).

Il faut également éviter d'introduire dans les exploitations saines des animaux infectés, d'où l'intérêt du contrôle sérologique avant toute nouvelle introduction.

Les vaccins à base de tachyzoïtes tués ne confèrent aucune protection contre la transmission verticale) (*Andrianarivo et al., 2000*). La solution pourrait venir du développement de vaccin recombinant en mesure d'induire une réponse humorale protectrice (*Hemphill et Gottstein, 2000*).

I. OBJECTIF

Notre étude expérimentale a eu comme objectif l'étude de la séro-prévalence de la néosporose bovine dans cinq wilayas du centre de l'Algérie.

Dans une première étape, un sondage sérologique par ELISA a été réalisé dans la région centre du pays, dans des exploitations dans lesquelles des avortements bovins ont été signalés et pour lesquelles des analyses sérologiques pour la recherche de la brucellose ont été négatives.

Dans une seconde étape, les sérologies trouvées positives en ELISA néosporose ont été testées en IFI.

II. MATERIELS & METHODES

1. CARACTERISTIQUES DES POPULATIONS BOVINES TESTEES

Les examens sérologiques effectués consistaient à rechercher la présence d'anticorps dirigés contre *N.caninum*. Ils ont été réalisés à partir de sérums de sang de vaches des wilayas de Blida, d'Alger, de Tipaza, de Médéa et de Ain Defla.

Les bovins retenus dans de cette étude sont des animaux suivis en prophylaxie de la brucellose par le Laboratoire Central Vétérinaire d'Alger. Au total, 17 exploitations ont été testées soit un total de 186 sérums analysés.

Même si ces troupeaux ne constituent pas exhaustivement l'ensemble du cheptel bovin de ces 5 wilayas, ils peuvent toutefois être considérés comme représentatifs de celui ci.

2. MATERIEL EXPERIMENTAL UTILISE

2.1 KIT ELISA

Le kit ELISA utilisé est le kit de détection produit et commercialisé par l'institut Pourquier (Montpellier, France). Il s'agit d'un kit de dosage immuno-enzymatique permettant la détection des anticorps anti-*Neospora caninum* dans le sérum des bovins.

Dans la présente étude, le kit utilisé portait le numéro de lot 631 et avait une date de péremption au mois de juillet 2008.

2.1.1 Description et principe du test

Le kit se présente sous la forme de 2 plaques de 96 cupules, sensibilisées avec de l'extrait antigénique purifié de *N. caninum*. Lors de l'incubation dans la cupule sensibilisée de l'échantillon à tester, les anticorps anti-*N. caninum* forment des complexes antigène-anticorps avec les antigènes fixés.

Après élimination par lavage des cupules le matériel non fixé, un conjugué anticorps monoclonal de souris anti-immunoglobulines de bovin couplée à la peroxydase de raifort, est ajouté. Ce conjugué se lie spécifiquement aux anticorps anti-*N. caninum* bovins fixés dans les cupules.

Au stade final de la réaction, le conjugué non lié est éliminé par lavage, puis un substrat enzymatique de la peroxydase de raifort, le peroxyde d'hydrogène, et un chromogène, le 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine (solution de révélation), sont ajoutés aux cupules.

Si l'immun-complexe est présent, l'enzyme provoque la transformation du substrat en un composé bleu, devenant jaune après blocage à l'aide de la solution d'arrêt (solution de H₂SO₄, 0,5 M).

L'intensité de la coloration obtenue est ainsi proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon testé.

Le seuil de positivité est défini à partir des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle positifs et négatifs fournis dans le kit et qui doivent être introduits dans chaque plaque.

2.1.2 Mode opératoire

Tous les réactifs du kit, à l'exception du conjugué et des échantillons de contrôle, sont sortis de l'enceinte réfrigérée où ils sont conservés pour être ramenés à température ambiante, une heure au moins avant le début des tests.

Pour éviter toute contamination croisée, les embouts de pipettes sont changés entre chaque échantillon.

Dépôt des sérums

Les échantillons de contrôle et les échantillons de sérum à tester, sont distribués sur une plaque sensibilisée de la manière suivante.

190 μ l de tampon de dilution sont déposées dans toutes les cupules et sont ensuite rajoutés dans :

- Û la cupule A1 : 10 μ l de sérum de contrôle négatif
- Û la cupule B1 et C1 : 10 μ l de sérum contrôle positif
- Û toutes les autres cupules : 10 μ l de sérum de tous les échantillons à tester

Les échantillons de contrôle et les sérums à tester sont ainsi dilués à 1/20 et sont identifiés sur la plaque grâce à un plan de plaque.

Incubation : Le contenu de la plaque est homogénéisé par une légère agitation et mise en incubation pendant 1 heure à +21°C (+/- 5° C).

Lavage : La plaque est vidée par un retournement puis lavée délicatement avec une solution spécifique trois fois.

Dépôt du conjugué

Un volume de 100 μ l de conjugué dilué au 1/100 est déposé dans chaque puits. La plaque est à nouveau incubée pendant 30 minutes à 21° C (+/- 5° C).

Révélation

Après trois lavages, un volume de 100 μ l de la solution de révélation est déposé dans chaque cupule. La plaque est incubée dans l'obscurité, durant 20 minutes, à 21° C (+/- 5° C).

Après ce laps de temps, 100 μ l de la solution d'arrêt sont déposées dans chaque cupule (figure 10).

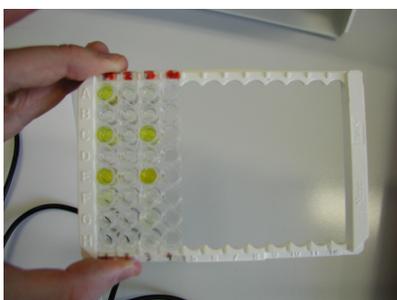


Figure 10 : Plaque ELISA après révélation

Lecture

Les densités optiques de chaque puit sont déterminées à la longueur d'onde de 450 nm, la valeur zéro du photomètre est mesurée à 450 nm sur l'air.

Critères de validation de la réaction

Le test n'est validé que si :

- Les contrôles positifs ont une valeur moyenne minimale de 0,350
- Le rapport moyenne des contrôles positifs / contrôle négatif est supérieur à 3,5.

Interprétation et détermination du statut des sérums

Pour chaque sérum le rapport suivant est calculé:

$$\frac{DO \text{ de l'échantillon à tester} - DO \text{ du contrôle négatif}}{DO \text{ Moyenne des contrôles positifs} - DO \text{ du contrôle négatif}} \times 100$$

DO mesurée à 450 nm

- Tout échantillon dont le rapport est inférieur ou égal à 30% est considéré comme négatif
- Tout échantillon dont le rapport est compris entre 30% et 40% est considéré comme douteux
- Tout échantillon dont le rapport est supérieur ou égal à 40% est considéré comme positif

Fiabilité du test

Les résultats chiffrés cités ci dessous sont fournis par le fabricant (fiche de contrôle qualité).

Sensibilité : analyse de 21 sérums d'animaux connus infectés résultats : 100% de positifs

Spécificité : analyse de 110 sérums d'animaux connus négatifs résultats : 100% de négatifs

Ce kit semble donc être, au vu de ces résultats, spécifique et sensible. Il peut être utilisé aussi bien pour une évaluation individuelle que pour un diagnostic de groupe (troupeau).

2.2 TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECT

Le test d'immunofluorescence indirect (IFI) utilisé dans le cadre de ce travail, est un test développé en interne par l'unité de virologie du laboratoire départemental de l'Orne en France.

Ce test, considéré comme la méthode de référence, est utilisé en routine pour le diagnostic sérologique de la néosporose bovine et canine.

Le test IFI permet, à la différence du test ELISA décrit précédemment, de quantifier les titres en anticorps anti-*Neospora caninum*. Il fournit de cette manière au vétérinaire praticien, les éléments d'interprétation qui lui permettront de rapporter un avortement bovin à un éventuel épisode de néosporose ou non.

2.2.1 Description et principe du test

L'immunofluorescence indirecte permet de rechercher dans les sérums de bovins ou de canidés, la présence d'anticorps spécifiques de *Neospora Caninum*.

Les sérums à tester sont mis en contact avec des tachyzoites entiers, produits sur culture cellulaire, purifiés par centrifugation et fixés sur des lames en verre. Après incubation et lavage, les lames sont recouvertes d'un sérum anti IgG de bovin ou de chien produits sur lapin et couplés à la fluorescéine. A l'issue d'une seconde incubation et d'un lavage, la présence des complexes immuns est révélée après lecture au microscope à fluorescence.

2.2.2 Production des tachyzoites

La souche de *Neospora caninum* dénommée isolat NC-1 a été utilisée pour la production de notre antigène. Cette souche a été fournie au laboratoire départemental de l'Orne par le Pr DUBEY en 1996.

Des cellules Véro (cellules de rein de singe vert d'Afrique), sont utilisées entre le 20^e et le 80^e passage. Ces cellules sont cultivées en milieu MEM (Minimum Essential Medium), additionné de 10% de sérum de cheval et d'antibiotiques.

L'infection des cellules Véro, entretenues en flacon de 75 cm², est réalisée par contact avec une solution contenant entre 100.000 et 150.000 tachyzoites, repris dans 2ml de milieu MEM sans sérum de cheval.

Après infection, les cellules sont entretenues avec du milieu MEM ne contenant plus que 2% de sérum de cheval. Dès que l'effet cytopathogène du parasite atteint près de 80% du tapis cellulaire, le fond des boîtes est raclé et les surnageants des flacons de culture infectés sont récoltés et centrifugés à 8000 g durant 15 minutes.

2.2.3 Purification des tachyzoïtes

Après centrifugation, les culots sont récupérés et remis en solution dans du milieu MEM. Les préparations obtenues sont remises en suspension par agitation et passées à l'aide d'une seringue de 20 ml à travers une aiguille de 25 G, ceci afin de casser les vacuoles parasitophores contenues dans le cytoplasme des cellules Véro.

La suspension obtenue est filtrée à travers un filtre de 5µm afin de briser les agrégats de tachyzoïtes, le filtrat est récupéré et il est de nouveau centrifugé à 8000 g durant 15 minutes et le culot obtenu est repris dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline), pH : 7,3-7,4 et est gardé à - 80°C.

A partir de 10 flacons de culture de 75 cm² de cellules Véro infectées avec la souche de *Neospora caninum* NC-1, on obtient en général 10 à 12 ml d'une suspension contenant entre 3 à 5 x10⁶ tachyzoïtes par ml.

2.2.3 Mode opératoire du test IFI

Le test IFI *Neospora Caninum* est réalisé en 2 temps.

Il est effectué dans un premier temps, sur des sérums dilués à 1/40 en tampon PBS, une épreuve qualitative, qui permettra de détecter les sérums positifs.

Dans une seconde étape, les sérums trouvés positifs sont re-testés après dilution de 1/80 à 1/1280 en tampon PBS pour quantifier leur titre en anticorps.

Pour la réalisation de ce test IFI, qu'il soit qualitatif ou quantitatif, 2 sérums contrôles sont utilisés, l'un positif jusqu'à la dilution de 1/1280 et l'autre négatif.

Sensibilisation des lames de verre CML à 10 spots d'un diamètre de 7 mm

Les lames de verre sont sensibilisées avec 20 µl de la suspension de tachyzoïtes précédemment préparée, additionnée de 2% de formaldéhyde. Les lames sont séchées à l'air puis fixées à l'acétone à température ambiante durant 15 minutes. On laisse s'évaporer l'acétone, puis les lames sont congelées.

Dépôt des sérums

Les lames de verre sensibilisées sont sorties du congélateur et laissées à température ambiante durant 30 minutes pour décongeler, puis numérotées et identifiées.

On dépose dans les spots concernés 20 µl de sérum dilué, puis les lames sont mises à incuber en atmosphère humide à 37° C durant 30 minutes.

Les lames sont par la suite rincées en bain de tampon PBS, sous agitation magnétique pendant 15 minutes. Puis séchées à l'étuve à 37° C durant 15 minutes, après rinçage à l'eau distillée.

Dépôt du sérum de lapin anti IgG de bovin couplé à la fluorescéine

On dépose dans chacun des spots 20 µl de sérum fluorescent de lapin anti IgG de bovin dilué à 1/400 dans du tampon PBS. Les lames subissant les mêmes étapes de rinçage et de séchage que précédemment, excepté le fait que celles-ci se déroulent à l'abri de la lumière.

Lecture

Les lames sont montées en recouvrant les spots de glycérine tamponnée pour immunofluorescence, diluée à 1/10 en PBS, et en recouvrant les lames de lamelles.

La lecture se fait ensuite au microscope à immunofluorescence, en chambre noire, à sec dans un premier temps au grossissement 40, puis en immersion au grossissement 100. On commence toujours par la lecture de la lame témoin, où se trouvent les contrôles positif et négatif.

Critères de validation de la réaction

La réaction n'est validée que si les sérums contrôles sont retrouvés aux valeurs attendues, c'est à dire négatif pour le sérum de contrôle négatif et positif à une dilution près de la valeur attendue pour le sérum contrôle positif.

Interprétation et détermination du statut des sérums

Pour que la réaction d'immunofluorescence puisse être considérée comme spécifique, il n'est tenu compte que des réactions de fluorescence sur les tachyzoites spécifiquement périphériques. Le titre sérique retenu est celui de la dilution du sérum qui donne ce type de réaction en dilution limite.

III. RESULTATS

1. Dépistage sérologique de *Neospora caninum* par ELISA dans l'Algérois

Tableau I : Résultats du sérodiagnostic par ELISA sur 196 prélèvements testés

Négatif	Douteux	Positif
156	10	20

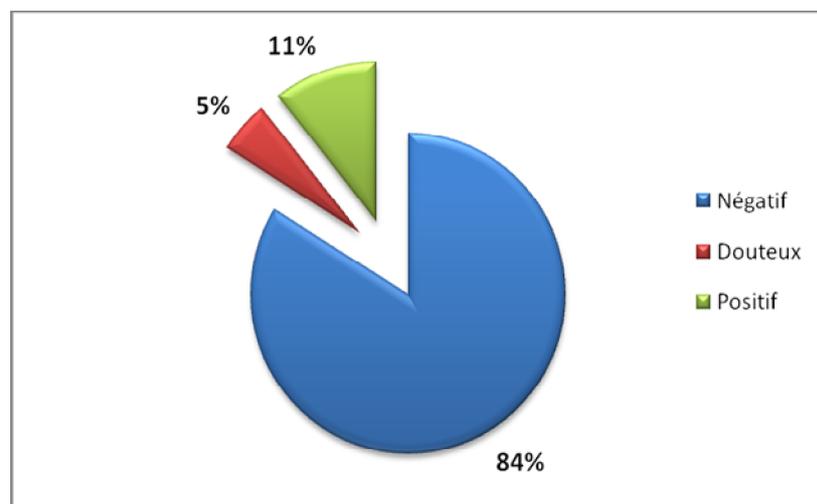


Figure 1 : Résultats exprimés en pourcentages du sérodiagnostic par ELISA

Sur les 186 prélèvements analysés par ELISA, 20 sérums se sont révélés positifs pour *Neospora. caninum* soit un taux de séropositivité de 11 %. En revanche 84 % des sérums analysés étaient séronégatifs.

Enfin, 5 % des échantillons analysés ont présenté un rapport de DO situé entre 30 % et 40 %, ils ont été par conséquent considérés comme douteux.

2. Etude de la sérologie *Neospora caninum* par wilaya

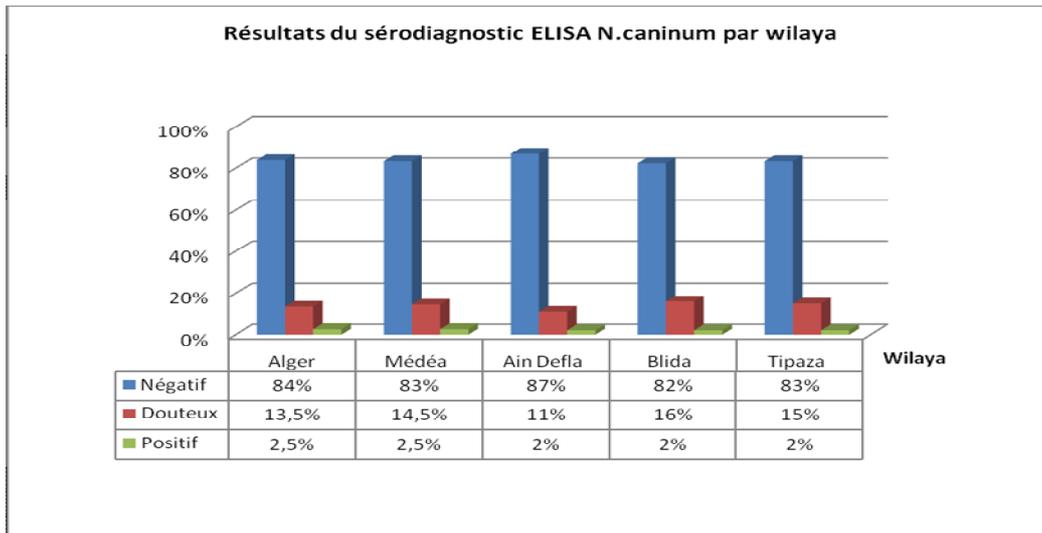


Figure 2 : Résultats du sérodiagnostic ELISA vis-à-vis de *N.caninum* par wilaya

L'étude du statut sérologique de la population bovine testée pour *Neospora caninum* par wilaya révèle un taux de séropositivité de 2% - 2.5 % pour les cinq wilayas étudiées. Les taux de séronégativité se situent entre 82% et 84 %.

3. Résultats de l'étude en IFI des sérums révélés positifs ou douteux en ELISA

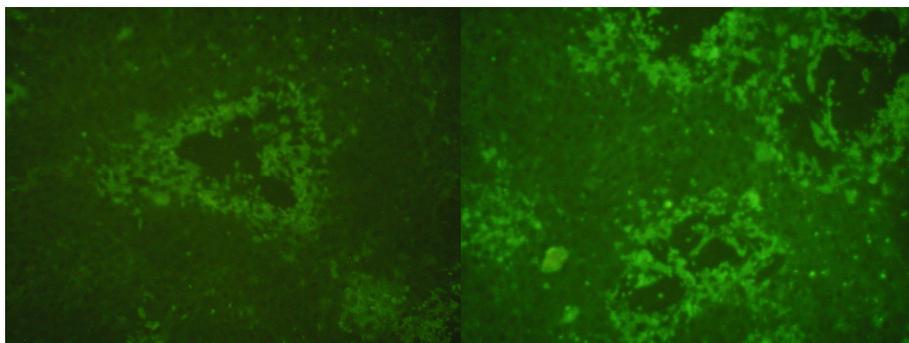
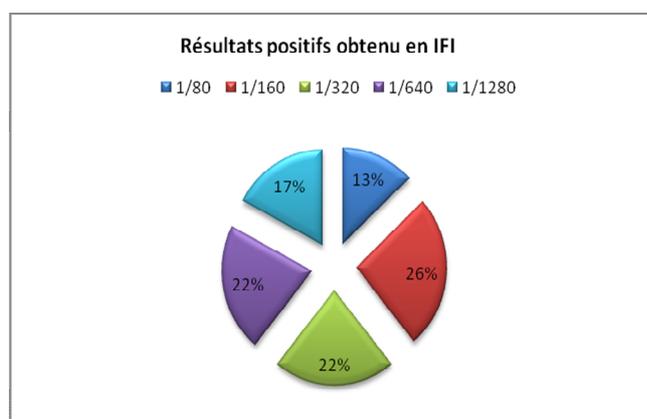


Figure 3 : Fluorescence globale observée à l'aide d'un sérum positif sur tapis cellulaire de cellules Véro infectées par la souche NC-1de *N. caninum*

Tableau II : Résultats du test IFI sur les sérums révélés positifs ou douteux en ELISA

Dilution	Nombres de sérum positifs en IFI	Pourcentage de sérums positifs par nombres totaux de sérum testés
1/80	3	13%
1/160	6	26%
1/320	5	22%
1/640	5	22%
1/1280	4	17%

**Figure 4 :** Résultats positifs obtenus en IFI

Les résultats de confirmation obtenus en IFI montrent que tous les sérums donnés positifs par l'ELISA ont été retrouvés positifs en IFI, avec des titres sériques allant de 1/80 à 1/1280. Parmi les dix sérums trouvés douteux en ELISA, trois sérums ont été rendus positifs en IFI, un avec un titre de 1/160 et les deux autres avec des titres de 1/80.

DISCUSSION & CONCLUSION

Le diagnostic de la néosporose bovine est souvent un diagnostic complexe et souvent délicat puisque l'infection par *Neospora caninum* peut être asymptomatique. Divers techniques ont été développées pour mettre en évidence le parasite ou les signes de son infection : des techniques sérologiques comme l'IFI, l'ELISA ou le Western Blot ; et des méthodes de détection directe telles que l'immunohistochimie, culture, inoculation et PCR). Dans le cadre de notre étude la situation sérologique de la population bovine de l'Algérois, nous avons opté pour les tests ELISA et IFI.

La technique ELISA a été retenue dans le cadre du screening rapide de l'ensemble de l'effectif testé soit les 186 prélèvements recueillis. L'IFI, technique de référence a été quant à elle utilisée dans le cadre de la confirmation des résultats obtenus sur les sérums testés positifs par la première technique.

Le dépistage sérologique par ELISA a permis ainsi de révéler un taux de séropositivité de 11 % sur l'ensemble de la population testée. Ce qui laisse supposer que le protozoaire

N.caninum circule effectivement dans la population bovine de région de l'algérois. L'étude du statut sérologique des bovins des cinq wilayas du centre ne montre pas de réelle différence.

Les titres des sérums positifs en IFI plaident en faveur d'avortement

Les résultats sérologiques obtenus au cours de cette étude ont montré que la néosporose bovine est présente au niveau d'un grand nombre d'exploitations, au total 11 exploitations sur 17 testées ont au moins un animal à sérologie positive en ELISA confirmée en IFI.

Le taux de séroprévalence de 11% trouvé dans la région centre de l'Algérie , correspond pratiquement à celui déjà signalé pour un grand nombre de pays comme par exemple , la France et le Canada .Ce taux de prévalence pouvant être relié au fait que les animaux testés sont pour la plupart des animaux importés d'Europe .

Nos résultats ELISA, notamment ceux concernant les sérums rendus douteux par ce test , confirme que la méthode par immunofluorescence indirecte est plus sensible .Le test ELISA est effectivement un moyen de diagnostique sérologique à utiliser en screening, car il permet de tester en même temps et dans les même conditions de répétabilité et de reproductibilité un grand nombre de sérums .

De nombreux auteurs s'accordent à dire que des sérologies positives en IFI à des titres supérieurs ou égales à 1/640 peuvent être rapportés à des épisodes abortifs, dus à *Neospora caninum*. Dans le cas de cette étude 39% des sérums confirmés par l'IFI, ont des titres sériques supérieurs ou égal à 1/640. Malheureusement, malgré tous nos efforts, conjugués à ceux du laboratoire central d'Alger, il ne nous a pas été possible d'avoir des précisions auprès des éleveurs concernant la présence ou non d'avortements dans les exploitations testés.

En conclusion, il nous apparaît important de reprendre cette étude sérologique sur des animaux locaux appartenant à des races autochtones, pour vérifier notamment si cette pathologie est présente au sein de cette population animale. Par ailleurs, il nous paraît opportun de prévoir rapidement, la mise en place d'un test sérologique *Neospora caninum* lors des contrôles effectués par les services vétérinaires officiels du ministère de l'Agriculture sur les animaux importés.

Cette étude a permis de mettre en évidence sérologiquement la présence de *N. caninum* dans le cheptel bovin dans l'Algérois. Par conséquent l'implication de *N. caninum* dans certains épisodes abortifs ne devrait pas être à écarter. Devant les pertes économiques potentiellement engendrées par cet agent abortif, il est évident que des études complémentaires et plus précises sur la séroprévalence et l'épidémiologie de *N. caninum* sont nécessaires et surtout celles portant sur son incidence sur les avortements bovins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1. ANDRIANARIVO ML, CHOROMANSKI L, Mc DONOUGH SP, PACKHAM AE, CONRAD PA:**
Immunogenicity of a killed whole *Neospora Caninum* Tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. International Journal of Parasitology. 1999, 29: 1613-1625
- 2. BARR BC, ANDERSON ML, SVERLOW KW, CONRAD PA:**
Diagnosis of bovine fetal *Neospora* Infection with an indirect fluorescent antibody test. Vet. Rec. 1995, 137 : 611-613
- 3. BAZLER TV, GAY LJC, LONG MT, MATHISON BA:**
Detection by PCR of *Neospora Caninum* in foetal tissues from spontaneous bovine abortions. J. Clin. Microbiol. 1999, 37: 4059-4064
- 4. BERGERON N, FECTEAU G, VILLENEUVE A, GIRARD Ch, PARE J:**
Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. Vet, Parasitol. 2001, 97 : 145-152
- 5. BERGERON N, FECTEAU G, PARE J, MARTINEAU R, VILLENEUVE A :**
Vertical and horizontal transmission of *Neospora Caninum* in dairy herds in Québec. Can. Vet. J. 2000, 41 : 464-469.
- 6. BJERKAS N, MOHN SF, PRESTHUS J:**
Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd. 1984, 70 : 271-274
- 7. BJORKMAN C, JOHANSSON O, STENLUND S, HOLMDAHL OJM, UGGLA A.**
Neospora species infection in a herd of dairy cattle. J. Am. Vet. Assoc. 1996, 208 : 1441-1444
- 8. BOURDOISEAU G :**
Connaissances actuelles sur l'épidémiologie de la néosporose en France. Société Française de Buiatrie. 2000, 116-118
- 9. BRUGERE-PICOUX J, ADLER C, CHASTANT C, MILLEMANN Y, REMY D :**
La néosporose bovine : une cause majeure d'avortement ?
Bulletin mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France. 1996 -201
- 10. COLLANTES-FERNANDEZ E, ZABALLOS A, ALVAREZ-GARCIA G, ORTEGA- MORA LM:**
Quantitative detection of *Neospora Caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally Infected mice by real-Time PCR. J. Clin. Microbiol. 2002, 40 : 1194-1198

- 11. CONRAD PA, BARR BC, SVERLOW KW, ANDERSON M, DAFT B, KINDE H, DUBEY JP, MUNSON L, ARDANS A :**
In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp from aborted bovine fetuses. Parasitology. 1993,106 : 239-249
- 12. CRAWSHAW WM, BROCKLEHURST S :**
Abortion epidemic in a dairy herd associated with horizontally transmitted *Neospora Caninum* infection. Vet. Rec. 2003, 152 : 201-206
- 13. DIJKSTRA Th, BARKEMA HW, EYSKER M, HESSELINK JW, WOUDA W:**
Natural transmission routes of *Neospora Caninum* between farm dogs and cattle. Vet,Parasitol. 2002, 105 : 99-104
- 14. DUBEY JP, HATTEL AL, LINDSAY DS, TOPPER MJ:**
Neonatal *Neospora Caninum* infection in dogs : Isolation of the causative agent and experimental transmission. Am. Vet. Med. Assoc. 1988, 193 : 1259-1263
- 15. DUBEY JP, LINDSAY DS, ADERSON ML, DAVIS SW, SHEN SK:**
Induced transplacental transmission of *Neospora Caninum* in cattle. Am. Vet. Med. Assoc. 1992, 201 : 709-713
- 16. DUBEY JP, LINDSAY DS :**
A review of *Neospora Caninum* and Neosporosis. Vet, Parasitol. 1996, 67 : 1-59
- 17. DUBEY JP :**
Neosporosis in cattle : biology and economic impact. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1999, 214, 1160-1163
- 18. DUBEY JP, Shares G :**
Diagnosis of bovine neosporosis. Vet Parasitol. 2006 31;140(1-2):1-34.
- 19. . DUBEY JP, SCHARES G, ORTEGA-MORA LM:**
Epidemiology and control of Neosporosis and *Neospora Caninum*. Clin. Microbiol. Rev. 2007, 20: 323-367
- 20. ELLIS J, LUTTON K, BAVERSTOCK PR, BRINDLEY PJ, NIMMO KA, JOHNSON AM:**
The phylogeny of *Neospora Caninum*. Mol. Biochem. Parasitol. 1994, 64 : 303-311
- 21. ESPOSITO M, STETTLER R, MOORES SL, PIDATHALA C, MULLER N, STACHULSKI A, BERRY NG, ROSSIGNOL JF, HEMPHILL A:**
In vitro efficacies of nitazoxanide and other thiazolides against *Neospora Caninum* tachyzoites reveal antiparasitic activity independent of the nitro group. Antimicrob. Agents Chemther. 2005, 49 : 3715-3723

22. **GHALMI F, CHINA B, KAIDI R, DAUBE G, LOSSON B:**
Detection of *Neospora caninum* in dog organs using real time PCR systems. *Vet Parasitol.* 2008. Apr 22.
23. **GOTTSTEIN B, EPERON S, DAI WJ, CANNAS A, HEMPHILL A, GREIF G:**
Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora Caninum* infection in mice. *Parasitol. Res.* 2001, 87: 43-48
24. **HARKINS D, CLEMENTS DN, MALLEY S, MARKS J, WRIGHT S, ESTEBAN I, INNES EA, BUXTON D:**
Western Blot analysis of the IgG responses of ruminants infected with *Neospora Caninum* and with *Toxoplasma gondii*. *J. Comp. Path.* 1998, 119: 45-55
25. **HASSIG M, GOTTSTEIN B:**
Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora Caninum* on Swiss dairy Farms. *Vet. Rec.* 2002, 150: 538-542
26. **HOWE DK, TANG K, CONRAD PA, SVERLOW K, DUBEY JP, SIBLEY D:**
Sensitive and specific identification of *Neospora Caninum* infection of cattle based on detecting of serum antibodies to recombinant Ncp29. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9 : 611-615
27. **JOLY A :**
Néosporose bovine : Observation dans 162 élevages et suivi de 35 élevages contaminés. *Bull. Group. Tech. Vét.* 2000, 7: 115-120
28. **KLEIN F, HIETALA SK, BERTHET H, VERY P, GRADINARU D:**
Neospora Caninum : enquête sérologique sur les avortements des bovins normands et Charolais.
Point Vét. 1997, 28 : 1283-1286
29. **KLEIN F, OULD-AMROUCHE A, OSDOIT C, TOURATIER A, MOEZ S :**
Neospora Caninum : une enquête séroépidémiologique dans l'Orne. *Bull. Group. Tech. Vét.* 2000, 7: 121-125
30. **LIU J, WANG M, LIU Q, DENG C, DING J:**
Serodiagnosis of *Neospora Caninum* infection in cattle using a recombinant tNcSRS2. Protein based ELISA. *Vet. Parasitol.* 2007: 143: 358-363
29. **MAINAR-JAIME RC, THURMOND MC, BERZAL-HERRANZ B, HIETALA SK:**
Séroprévalence of *Neospora Caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain.
Vet. Rec. 1999, 145 : 72-75
31. **MARQUER A, CHERMETTE R :**
La néosporose chez les bovins. *Le Point Vétérinaire.* 2000, 31, 293-298

- 32. MEENAKSHI M, SANDHU KS, BALL MS, KUMAR H, SHARMA S, SIDHU PK, SREEKUMAR C, DUBEY JP:**
Seroprevalence of *Neospora Caninum* antibodies in cattle and water buffaloes in INDIA. J. Parasitol. 2007, 93: 1374-1377
- 33. . ORTEGA YR, TORRES MP, MENA KD:**
Presence of *Neospora Caninum* specific antibodies in three dairy farms in Georgia and two in Texas. Vet. Parasitol. 2007, 144: 353-355
- 34. MOHAMED OULD-AMROUCHE A, KLEIN F, OSDOIT C, HO, TOURATIER A, MOEZ S, MIALLOT JP:**
Estimation of *Neospora Caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. Vet. Res. 1999, 30: 531-538
- 35. PACKHAM AE, SVERLOW KW, CONRAD PA, LOOMIS EF, ROWWE JD, MARK LA, MARSH AE, CRAY C, BARR CB:**
A modified agglutination test for *Neospora Caninum*: Development, optimization and comparison of the indirect fluorescent antibody test and enzyme linked immunosorbent assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998, 5 : 467-473
- 36. PAN Y, JANSEN GB, DUFFIELD TF, HIETALA S, KELTON D, LIN CY, PEREGRINE AS:**
Genetic susceptibility to *Neospora Caninum* infection in Holstein cattle in Ontario. J. Dairy. Sci. 2004, 87 : 3967-3975
- 37. PARE J, FECTEAU G, FORTIN M, MARSOLAIS G :**
Seroepidemiologic study of *Neospora Caninum* in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998, 213 : 1595-1598
- 38. PARE J, FECTEAU G, FORTIN M, MARSOLAIS G :** Seroepidemiology study of *Neospora Caninum* in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998, 213, 1595-1598
- 39. PAYNE S, ELLIS JT :**
Detection of *Neospora Caninum* DNA by the Polymerase Chain Reaction. Int. J. Parasitol. 1996, 26 : 347-351
- 40. PITEL PH, PRONOST S, CHATAGNON G, TAINIRIER D, FORTIER G, BALLETT JJ:**
Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: détection of *Néospora Caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N.caninum* in cattle and dogs. Vet. Parasitol. 2000, 102: 269-277.
- 41. ROMAND S, THUILLIEZ P, DUBEY JP:**
Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora Caninum* infection. Parasitology Research. 1998, 84, 50-53
- 42. SAGER H, FISHER I, FURRER K, STRASSER M, WALDVOGEL A, BOERLINP, AUDIGE L, GOTTSTEIN B:**
A swiss case- control study to assess *Neospora Caninum* associated bovine abortions by PCR, histology and serology. Vet. Parasitol. 2001, 102: 1-15.

- 43. SCHARES G, PETERS M, WURM R, BARWALD A, CONRATHS FJ:**
The efficiency of vertical transmission of *Neospora Caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet. Parasitol.* 1998, 80 : 87-98.
- 44. THURMOND MC, HIETALA SK :**
Culling associated with *Neospora Caninum* infection in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research.* 1996, 57, 1559- 1562
- 45. THURMOND MC, HIETALA SK, BLANCHARD PC:**
Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing Bovine abortion caused by *Neospora Caninum* in a dairy herd. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 1999, 11: 90-94
- 46. WALDNER CL, CUNNINGHAM G, CAMPBELL JR:**
Agreement between three serological tests for *Neospora Caninum* in beef cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004, 16: 313-315
- 47. WAPENAAR W, BARKEMA HW, O'HANDLEY RM, BARTELS CJ:**
Use of an enzyme linked immunosorbent assay in bulk milk to estimate the prevalence of *Neospora Caninum* on dairy farms in Prince Edward Island, Canada. *Can. Vet. J.* 2007, 48: 493-499
- 48. WILLIAMS DJL, DAVISON HC, HELMICK B, Mc GUARRY J, GUY F, OTTE A, TREES AJ:**
Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora Caninum* in Cattle. *Vet. Rec.* 1999, 145: 571-575
- 49. WILLIAMS DJL, GUY CS, SMITH RF, ELLIS J, BJORKMAN c, REICHEL MP, TREES AJ:**
Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora Caninum* confers protection against fetal death. *Infect. Immun.* 2007, 75: 1343-1348
- 50. WOUDA W, DUBEY JP, JENKINS MC:**
Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *Journal of Parasitology.* 1997, 83, 545-547
- 51. ZHANG W, DENG C, LIU Q, LIU J, WANG M, TIAN KG, YU XL, HU DM:**
First identification of *Neospora Caninum* antibodies infection in aborted bovine fetuses in CHINA. *Vet. Parasitol.* 2007, 149 : 72-76

RESUME

La néosporose bovine est une protozoose parasitaire, responsable de symptômes nerveux chez les jeunes animaux et surtout d'avortement, parfois épidémiques chez l'adulte. L'agent causal *Neospora caninum* infecte les bovins selon deux modes de transmission : horizontal et vertical. Les avortements induits, entraînent d'importantes pertes économiques dans les élevages contaminés. Pour l'heure, seules des mesures de lutte sanitaires sont possibles, il n'existe ni traitement, ni vaccins réellement efficaces.

La situation épidémiologique en Algérie concernant cette parasitose, est pour le moment pratiquement inconnue. Notre étude expérimentale a eu comme objectif l'étude de la prévalence de la néosporose bovine dans la région centre de l'Algérie.

Les résultats du dépistage sérologiques par ELISA, confirmés par IFI ont permis de mettre en évidence un taux de séropositivité de 11 % dans la population bovine testée.

Mots clefs : néosporose – bovine – séroprévalence- ELISA- IFI-Algérois

ABSTRACT

The bovine neosporosis is a parasitic protozoose. It causes nervous symptoms on young animals and especially abortion sometimes epidemic in adults. The causative agent *Neospora caninum* infects cattle in two modes of transmission: horizontal and vertical. The induced abortions, cause significant economic losses in livestock contaminated. Currently, only sanitary measures are possible, there is no treatment or vaccine really effective.

The epidemiological situation in Algeria on this parasitosis, is currently virtually unknown. Our experimental study had as objective the study of the prevalence of bovine neosporosis in the central region of Algeria. The results of serological screening by ELISA, confirmed by IFI have identified a seropositivity rate of 11% in the cattle population tested.

Keywords: neosporosis - cow - seroprevalence-ELISA-IFI- Algérois