



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم والبحث العلمي
UNIVERSITE CONSTANTINE 1
جامعة Constantine 1
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
معهد العلوم البيطرية
DEPARTEMENT DE MEDECINE CHIRURGIE ET REPRODUCTION ANIMALE
قسم الطب والجراحة والتفشيروالحيوي



Thèse

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

Option

Pathologie de la Reproduction

L'AVORTEMENT ENZOOTIQUE DES BREBIS : Séroprévalence et caractérisation moléculaire de *Chlamydia abortus* dans la wilaya de Constantine

Soutenue publiquement par :

HIRECHE Sana

Née le 17 juillet 1984 à Constantine

Devant le jury

Président : BERERHI El-Hacène	Professeur	Université Constantine 1
Examineurs		
GHALMI Farida	Maitre de conférences A	Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire
KABOUIA Rachid	Professeur	Université Constantine 1
LAFRI Mohammed	Professeur	Université Saad Dahlab BLIDA
NEZZAL Lahcène	Professeur	Université Constantine 3
Directeur de thèse : BOUAZIZ Omar	Professeur	Université Constantine 1



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
UNIVERSITE CONSTANTINE 1
جامعة Constantine 1
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
معهد العلوم البيطرية
DEPARTEMENT DE MEDECINE CHIRURGIE ET REPRODUCTION ANIMALE
قسم الطب والجراحة والتفكير الحيواني



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat es Sciences en Sciences Vétérinaires

Option

Pathologie de la Reproduction

L'AVORTEMENT ENZOOTIQUE DES BREBIS : Séroprévalence et caractérisation moléculaire de *Chlamydia abortus* dans la wilaya de Constantine

Soutenue publiquement par :

HIRECHE Sana

Née le 17 juillet 1984 à Constantine

Remerciements

Au terme de ce doctorat nous tenons à remercier:

Monsieur le Professeur **BERERHI El-Hacène**,
Professeur à l'Université Constantine 1 et Directeur de l'Institut des Sciences Vétérinaires,
Qui nous a fait l'insigne honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Pour ses grandes qualités humaines et pour l'image d'excellence qu'il voudrait bien
imprimer à notre Institut,
Hommages respectueux.

Notre directeur de thèse, Monsieur le Professeur **BOUAZIZ Omar**,
Professeur à l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université Constantine 1,
Pour sa bienveillance, son aide précieuse, sa disponibilité et son support scientifique,
Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Madame **GHALMI Farida**,
Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger,
Qui nous a fait l'honneur de faire partie du jury de notre thèse,
Hommages respectueux.

Monsieur **KABOUIA Rachid**,
Professeur à l'Université Constantine 1,
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

Monsieur le Professeur **LAFRI Mohammed**,
Professeur à l'Université Saad Dahleb Blida,
Qui nous a fait l'honneur de juger ce travail,
Hommages respectueux.

Monsieur le Professeur **NEZZAL Lahcène**,
Professeur à l'Université Constantine 3,
Qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail,
Hommages respectueux.

Remerciements

Nos remerciements vont également :

A Monsieur **ABABNEH Mustafa**,
Professeur à Jordan University of Science and Technologie, Irbid, Jordanie
Pour sa précieuse collaboration et son soutien indéfectible durant toute ma recherche,
Qu'il trouve ici l'expression de ma grande gratitude.

A Madame **DJENNA Djahida**,
Inspecteur vétérinaire à la Direction des Services Agricoles de la Wilaya de Constantine,
Pour nous avoir facilité l'accès aux élevages et son précieux accompagnement technique
Qu'elle trouve ici l'expression de notre grande reconnaissance.

Aux éleveurs de la Wilaya de Constantine qui ont bien voulu participer à cette recherche,
Sincères remerciements.

A tout le corps enseignant de l'Institut des Sciences Vétérinaires, Université Constantine 1
D'avoir contribué à notre formation,
Sincères reconnaissance.

A tout le personnel administratif pour sa contribution permanente,
Sincères remerciements.

Dédicace

A la mémoire de ma très chère sœur qui a quitté soudainement ce monde à la fleur de l'âge...

« Zahira »

« Toi que nous aimons tant...tu vis toujours dans nos cœurs et tu resteras à jamais gravée dans nos mémoires ... Que dieu t'accueille dans son vaste paradis... »

اللهم ارحم أختي كل ثانية في قبرها

اللهم اجعل قبرها روضة من رياض الجنة، أنزه و اجعله واسعا دائما و أبدا

اللهم آمين

...

Dédicace

“Where would I be without my family?”

Je Dedie ce travail à ma famille

Ma source intarissable d’amour et de bonheur

...

Aux êtres les plus chers au monde

« Papa et Maman »

*Ce travail vous est dédié en témoignage de votre amour, de vos sacrifices et de la meilleure
éducation que m’avez fournis*

Vos prières et votre contentement m’ont toujours guidé à acquérir tout le bien

Dieu vous donne santé et longue vie

...

Aux plus belles sœurs au monde

« Amira », « Rayene » et l’adorable petite « Syrine »

Pour toute la joie, amour et amitié qu’elles ne cessent de m’offrir

...

A mes frères

« Mohamed » et « Borhane » pour leur amour et soutien permanent

...

A mon fiancé « Yacine »

Pour son soutien et ses encouragements

...

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Table des matières	i
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	ix
Liste des annexes.....	xii
Liste des abréviations	xiii
INTRODUCTION GENERALE	1
PREMIERE PARTIE :	
REVUE DE LITTERATURE	
I. Epidémiologie de l'avortement enzootique des brebis	4
1. Définition	4
2. Synonymie	4
3. Espèces affectées	4
4. Historique des chlamydies	4
5. Importance de la chlamyidiose abortive ovine	6
5.1. Santé animale	6
5.2. Santé publique	7
5.3. Impact économique	7
6. Aspects relatifs à la santé publique	7
7. Epidémiologie descriptive	8
8. Epidémiologie analytique	9
8.1. Taxonomie des <i>Chlamydiae</i>	9
8.2. Caractères généraux des chlamydies	12
8.2.1. Caractères bactériologiques	12
8.2.2. Structure physique et chimique	12
8.2.2.1. Les corps élémentaires (EBs)	12
8.2.2.2. Les corps réticulés (RBs)	13
8.2.3. Cycle de développement	14
8.2.4. Biochimie et métabolisme	15
8.3. Caractères antigéniques des <i>Chlamydiae</i>	15

8.3.1. Les antigènes de famille	16
8.3.2. Les antigènes d'espèce	16
8.3.3. Les antigènes spécifiques d'immunotypes	16
8.4. Résistance	16
8.5. Excrétion de <i>C. abortus</i> et sources potentielles d'infection	17
8.6. Transmission de l'infection	18
8.6.1. Voie digestive	18
8.6.2. Voie respiratoire	19
8.6.3. Autres voies	19
8.7. Sensibilité à l'infection	20
8.8. Pathogénie de l'avortement enzootique des brebis	20
9. Epidémiologie synthétique	25
II. Aspects cliniques et lésionnels de l'avortement enzootique des brebis	26
1. Signes cliniques	26
2. Lésions	27
III. Outils de diagnostic de l'avortement enzootique des brebis	33
1. Diagnostic direct	33
1.1. Bactérioscopie	33
1.2. Culture cellulaire	34
1.3. Culture sur œufs embryonnés	35
1.4. Technique des plages de lyse	35
1.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)	35
2. Diagnostic indirect ou diagnostic sérologique	37
2.1. Immunofluorescence	37
2.2. Test de fixation du complément (TFC)	38
2.3. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	38
IV. Diagnostic différentiel des avortements infectieux chez la brebis : Accent mis sur la coxiellose, la salmonellose, la néosporose et la brucellose	40
1. La brucellose (<i>Brucella melitensis</i>)	41
2. La salmonellose abortive (<i>Salmonella abortus ovis</i>)	42
3. La coxiellose	43
4. La néosporose	43
V. Mesures prophylactiques de l'avortement enzootique des brebis	45
1. Traitements antibiotiques	45

2. Prévention et contrôle de l'avortement enzootique ovin	45
2.1. Prévention	45
2.1.1. L'outil sanitaire	45
2.1.2. Les vaccins	46
2.2. Contrôle de l'avortement enzootique des brebis dans un élevage infecté	48

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE

I. Dépistage sérologique des infections abortives chez les brebis dans la wilaya de Constantine :	
Chlamydie, fièvre Q, brucellose, salmonellose abortive et néosporose	49
1. Introduction	49
2. Objectifs de l'étude	50
3. Présentation de la zone d'étude	50
3.1. Localisation géographique et superficie	50
3.2. Climat et pluviométrie	50
3.3. Hydrographie	51
4. Matériel et méthodes	52
4.1. Animaux	52
4.2. Période de l'étude	53
4.3. Conception de l'étude	53
4.4. Collecte des données épidémiologiques	54
4.5. Prélèvements de sang	55
4.6. Méthodes sérologiques	55
4.6.1. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) indirecte <i>Chlamydia</i> spp.	55
4.6.2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) indirecte <i>Coxiella burnetii</i>	56
4.6.3. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) compétitive <i>Neospora caninum</i>	56
4.6.4. Recherche des anticorps anti- <i>Salmonella abortus ovis</i> par séroagglutination lente	57
4.6.5. Recherche des anticorps anti- <i>Brucella melitensis</i> par séroagglutination rapide sur lame	57
4.7. Analyse statistique	57
5. Résultats	58
5.1. Prévalence des maladies abortives chez les brebis.....	58

5.2. Répartition des maladies abortives en fonction des élevages.....	59
5.3. Réponse sérologique multiple	60
5.4. Relation entre la séropositivité des brebis vis-à-vis de <i>Chlamydia</i> spp. et <i>Coxiella burnetii</i>	65
5.5. Facteurs significativement associés à la séropositivité vis-à-vis de la coxiellose	65
5.6. Facteurs associés à la séropositivité vis-à-vis de <i>Chlamydia</i> spp.....	66
5.7. Facteurs associés à la séropositivité vis-à-vis de la néosporose, salmonellose abortive et brucellose	66
6. Discussion	67
7. Conclusions	75
II. Séroprévalence et facteurs de risque associés à l'infection par <i>Chlamydia</i> spp. chez les brebis dans la wilaya de Constantine	76
1. Introduction	76
2. Objectifs de l'étude	77
3. Matériel et méthodes	77
3.1. Animaux	77
3.2. Méthode sérologique	77
3.3. Analyses statistiques	79
4. Résultats	80
4.1. Taux de séroprévalence de <i>Chlamydia</i> spp.	80
4.2. Les facteurs de risque associés à l'infection par <i>Chlamydia</i> spp. chez les brebis dans la wilaya de Constantine	84
5. Discussion	85
6. Conclusions	88
III. L'avortement enzootique des brebis : Prévalence et facteurs de risque associés à l'infection des brebis par <i>C. abortus</i> dans la wilaya de Constantine	89
1. Introduction	89
2. Objectifs de l'étude	89
3. Matériel et méthodes	90
3.1. Animaux	90
3.2. Analyse sérologique	90
3.3. Analyse statistique	93
4. Résultats	93
4.1. Séroprévalence de l'avortement enzootique des brebis	93

4.2. Analyse des facteurs de risque associés à l'infection par <i>C. abortus</i>	97
5. Discussion	97
6. Conclusions	102
IV. Caractérisation moléculaire de <i>Chlamydia abortus</i> par PCR-RFLP à partir de prélèvements de tissus fœtaux et de placentas ovins	103
1. Introduction	103
2. Objectifs	104
3. Matériel et méthodes	104
3.1. Cadre de l'étude	104
3.2. Recueil des échantillons d'avortons et placentas ovins	104
3.3. Préparation des prélèvements d'avortons et placentas ovins	105
3.4. Extraction manuelle de l'ADN à partir de tissus animaux	108
3.4.1. Principe de l'extraction manuelle par adsorption sur colonne	108
3.4.2. Protocole expérimental	108
3.5. Les amorces et fragment d'ADN cible	109
3.6. Amplification de l'ADN de <i>Chlamydia</i> spp. : la PCR proprement dite	110
3.6.1. Préparation du mélange réactionnel	110
3.6.2. Protocole PCR	111
3.7. Révélation des produits d'amplification	112
3.7.1. Préparation du tampon TBE 1x	112
3.7.2. Préparation du gel d'agarose 1,5 %	113
3.7.3. Migration des produits d'amplification : l'électrophorèse	113
3.7.4. Révélation des bandes d'ADN	114
3.8. Purification des produits d'amplification sur gel d'électrophorèse	114
3.9. Etude du profil de restriction enzymatique des produits amplifiés par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	115
3.10. Séquençage et analyses phylogénétiques	116
3.11. Histopathologie	116
3.12. Analyse statistique	117
4. Résultats	117
4.1. Statut sérologique des brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort-né vis-à- vis de la chlamydophilose	117
4.2. Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR	117
4.3. Analyse des amplicons par RFLP	119

4.4. Analyse de la relation entre les résultats de la PCR-RFLP et les facteurs liés aux brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort-né	121
4.5. Séquençage et analyse phylogénétique	122
4.6. Analyse histopathologique des placentas	123
5. Discussion	125
6. Conclusions	129
CONCLUSION GENERALE	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133
ANNEXES	
Résumé en français	
Résumé en arabe	
Résumé en anglais	

Liste des tableaux

Tableau 1.	Taxonomie des <i>Chlamydiae</i>	11
Tableau 2.	Distribution des brebis prélevées selon l'âge	52
Tableau 3.	Répartition des brebis prélevées par troupeau et par commune.....	53
Tableau 4.	Résultats du dépistage sérologique des maladies abortives sur sérums de brebis en provenance de la wilaya de Constantine	58
Tableau 5.	Résultats sérologiques des élevages vis-à-vis des maladies abortives	59
Tableau 6.	Nombre d'élevages ovins présentant un statut sérologique unique vis-à-vis des infections abortives ciblés	60
Tableau 7.	Nombre de troupeaux ovins présentant un statut immunitaire multiple envers les cinq agents abortifs ciblés	60
Tableau 8.	Répartition des brebis séropositives par troupeau et par commune.....	61
Tableau 9.	Distribution des échantillons séropositifs à deux agents abortifs ou plus par âge de la brebis testée et par commune	63
Tableau 10.	Distribution des brebis séropositives et séronégatives à <i>Chlamydia</i> spp. et <i>Coxiella burnetii</i>	65
Tableau 11.	Analyse univariée par le test de Khi-deux de Pearson des facteurs associés à la séropositivité des brebis vis-à-vis de <i>Coxiella burnetii</i>	65
Tableau 12.	Analyse univariée par le test de Khi-deux de Pearson des facteurs associés à la séropositivité des brebis vis-à-vis de <i>Chlamydia</i> spp. ($p < 0.05$).....	66
Tableau 13.	Distribution des brebis séropositives et séronégatives à <i>Chlamydia</i> spp. dans les 12 communes de la wilaya de Constantine.....	80
Tableau 14.	Distribution des brebis séropositives et séronégatives à <i>Chlamydia</i> spp. en fonction de la taille des troupeaux.....	81

Tableau 15.	Distribution des brebis séropositives et séronégatives à <i>Chlamydia</i> spp. en fonction des différents facteurs testés dans l'analyse univariée par le test du Khi-deux de Pearson	82
Tableau 16.	Analyse multivariée par régression logistique des facteurs associés à la séropositivité vis-à-vis de <i>Chlamydia</i> spp.	84
Tableau 17.	Distribution des brebis séropositives et séronégatives vis-à-vis de <i>C. abortus</i> en fonction des différents facteurs analysés par le test du Khi-deux de Pearson	95
Tableau 18.	Analyse par régression logistique multinominale des facteurs associés à l'infection par <i>C. abortus</i> chez les brebis de la wilaya de Constantine	97
Tableau 19.	Séquence des oligonucléotides Ch1 et Ch2 utilisés dans la PCR	110
Tableau 20.	Volume des composants utilisés dans la réaction d'amplification d'ADN de <i>Chlamydia</i>	111
Tableau 21.	Cycles de la PCR pour amplification de <i>C. abortus</i>	112
Tableau 22.	Nombre et nature des prélèvements <i>C. abortus</i> positifs et négatifs par PCR-RFLP	118
Tableau 23.	Distribution des résultats positifs et négatifs vis-à-vis de <i>C. abortus</i> par PCR-RFLP en fonction des tissus de fœtus testés positifs	118
Tableau 24.	Analyse par test du Khi-deux de l'association entre les facteurs relatifs aux brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort-né et la positivité en PCR vis-à-vis de l'avortement enzootique des brebis	121

Liste des figures

Figure 1.	Microscopie électronique en transmission purifiée (a) corps réticulé et (b) corps élémentaire	13
Figure 2.	Cycle de développement des <i>Chlamydiae</i>	15
Figure 3.	Représentation schématique d'un placentome ovin	22
Figure 4.	Fœtus et placenta provenant d'une brebis infectée expérimentalement par <i>C. abortus</i> à 70 jours de la gestation.....	24
Figure 5.	Inclusions de <i>Chlamydiae</i> dans les cellules du trophoblaste ovin AH-1 infectées par <i>C. abortus</i> pendant 72 heures, fixées avec de l'acétone.....	24
Figure 6.	Avorton de brebis (photo : Rook).....	28
Figure 7.	Placenta d'une brebis 28 jours après une infection expérimentale par <i>C. abortus</i>	28
Figure 8.	Placentome d'une brebis 28 jours après une infection expérimentale à <i>C. abortus</i> , fixé au formol, surface d'une coupe transversale.....	29
Figure 9.	Placentite à <i>C. abortus</i> chez une chèvre.....	29
Figure 10.	Chlamydophilose ovine (placentite).....	30
Figure 11.	Placentome d'une brebis 28 jours après l'infection expérimentale à <i>C. abortus</i>	31
Figure 12.	Membrane chorioallantoïdienne du placenta d'une brebis 28 jours après l'infection expérimentale par <i>C. abortus</i>	31
Figure 13.	Limbe placentomal 28 jours après infection expérimentale d'une brebis par <i>C. abortus</i>	32
Figure 14.	Carte représentative des douze communes de la wilaya de Constantine	51
Figure 15.	Carte représentative de Constantine et des wilayas voisines.....	51
Figure 16.	Prévalence des anticorps vis-à-vis des agents abortifs chez les brebis dans la wilaya de Constantine.....	59
Figure 17.	Lecture des résultats (densité optique) par un lecteur de plaques ELISA (Biotek, Elx800) à 450 nm	78
Figure 18.	Traitement des résultats sérologiques par le logiciel Gen5™	78

Figure 19.	Composition du kit ELISA ID-Screen <i>Chlamydophila abortus</i> Indirect Multi-species.....	92
Figure 20.	Distribution de 100 µl de la solution d'arrêt dans chaque puits avant la lecture des résultats	92
Figure 21.	Taux de séroprévalence de <i>Chlamydia abortus</i> chez les brebis en fonction de l'âge.....	93
Figure 22.	Taux de séroprévalence de <i>Chlamydia abortus</i> chez les brebis dans les 12 communes de la wilaya de Constantine.....	94
Figure 23.	Mort-nés ovins.....	106
Figure 24.	Avortons ovins	106
Figure 25.	Placentas ovins issus des cas d'avortements	107
Figure 26.	Préparation des échantillons de tissus fœtaux et placentas ovins avant extraction d'ADN	107
Figure 27.	Kit utilisé dans l'extraction d'ADN "QIAGEN DNeasy Blood & Tissue kit"..	108
Figure 28.	Composants pour la réaction d'amplification d'ADN à <i>Chlamydia</i> spp.....	111
Figure 29.	Réaction d'amplification d'ADN réalisée dans le thermocycleur Genpro BIOER®	112
Figure 30.	Système d'imagerie AlphaDigiDoc® RT, Alpha Innotech pour photographie du gel.....	114
Figure 31.	Enzyme <i>AluI</i> et tampon New England Biolabs® utilisés pour la digestion des produits d'amplification	115
Figure 32.	Placenta ovins fixés au formol	116
Figure 33.	Révélation sous ultra-violets des fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir des amorces Ch1 et Ch2	119
Figure 34.	Photographie de la migration sur gel d'agarose à 1,5% des produits d'amplification par PCR d'une portion du gène <i>omp2</i> avec le couple d'amorces spécifiques Ch1/Ch2	119
Figure 35.	Révélation sous ultra-violets des fragments d'amplicons du gène <i>omp2</i> digérés par l'enzyme <i>AluI</i> par technique RFLP.....	120
Figure 36.	Photographie de la migration sur gel d'agarose 2% des fragments de restriction enzymatique par <i>AluI</i> des amplicons du gène <i>omp2</i> de <i>C. abortus</i> (Ch1/Ch2)	120

Figure 37.	Séquence nucléotidique partielle du gène omp2 de la souche algérienne <i>Chlamydia abortus</i> amplifiée à partir de tissus fœtaux et de placentas de brebis avortées	122
Figure 38.	La matrice de similarité de séquence nucléotidique partielle du gène omp2 de la souche algérienne	122
Figure 39.	Arbre phylogénétique basée sur l'analyse des séquences nucléotidiques de 10 espèces de <i>Chlamydiae</i>	123
Figure 40.	Nécrose, vascularite avec infiltration de cellules inflammatoires de placentas ovins infectés naturellement par <i>C. abortus</i>	124

Liste des annexes

- Annexe 1 Matériel utilisé dans les techniques sérologiques
- Annexe 2 LSIVET RUMINANT SERUM CHLAMYDIOSIS ELISA KIT
- Annexe 3 LSIVET RUMINANT MILK/SERUM Q FEVER KIT
- Annexe 4 Trousse ELISA sérologique *Neospora caninum* : Trousse pour le diagnostic sérologique de *Neospora caninum* par la méthode ELISA. Test de blocage pour sérums sanguins
- Annexe 5 ID-Screen *Chlamydomphila abortus* Indirect Multi-species
- Annexe 6 Questionnaire du statut sanitaire et gestion des élevages ovins de la wilaya de Constantine
- Annexe 7 Matériel et produits chimiques employés pour le prélèvement des échantillons fœtaux et la caractérisation moléculaire de *Chlamydia abortus*
- Annexe 8 Séquences nucléotidiques des espèces de *Chlamydiaceae* employées dans l'alignement

Liste des abréviations

Abs :	Corps aberrants
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AEO :	Avortement enzootique ovin
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARN :	Acide ribonucléique
BRU :	Brucellose
CAM :	Membrane chorioallantoïdienne
<i>C. abortus</i> :	<i>Chlamydia abortus</i>
<i>C. burnetii</i> :	<i>Coxiella burnetii</i>
CHL :	Chlamydirose
DAPI :	4',6-diamidino-2-phenylindole
EAE :	Enzootic abortion of ewes
EB (<i>pluriel</i> : EBs) :	Elementary Body (corps élémentaire)
ELISA :	Enzyme linked immunosorbent assay
FAT :	Fluorescent Antibody Test
FITC :	Isothiocyanate de fluorescéine
FQ :	Fièvre Q
HE :	Hématoxyline-Eosine
IC :	Intervalle de confiance
IF :	Immunofluorescence
Ig :	Immunoglobuline
INRA :	Institut National de Recherche Agronomique
kDa :	kilodalton
LGV :	Lymphogranulomatose vénérienne
LPS :	Lipopolysaccharide
MIF :	Microimmunofleuroscence
MOMP :	Major Outer Membrane Protein
MSB :	Martius Scarlet Blue
NEO :	Néosporose
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre

µl :	Microlitre
nm :	Nanomètre
OIE :	Organisation internationale des épizooties
omp :	Outer membrane protein
OR :	Odds Ratio
<i>P</i> :	Seuil de significativité statistique
pb :	Paires de base d'ADN
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pH :	Potentiel hydrogène
PLT :	Psittacosis, Lymphogranuloma venereum Trachoma
RB (<i>pluriel</i> : RBs) :	Reticular Body (corps réticulé)
RBT :	Rose Bengale Test
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm :	Rotation par minute
SAL :	Salmonellose
spp. :	<i>Species pluralis</i>
TBE :	Tris-Borate-EDTA
TCF :	Test de fixation du complément
TWAR :	Taiwan acute respiratory agent
UV :	Ultraviolets
χ^2 :	Valeur du Khi-deux

Introduction générale

Introduction générale

Aujourd'hui, l'intérêt particulier accordé par l'état à la production animale dans un contexte de recherche d'autosuffisance alimentaire, met en évidence l'aspect typique des maladies de l'élevage et son impact sur le plan économique. La lutte contre ces maladies constitue alors un préalable à tout effort de croissance de l'élevage. Situation qui incite à l'urgence de mesures préventives auxquelles les autorités accordent de plus en plus une priorité sine qua non. Pour cela, la médecine vétérinaire doit jouer un rôle d'avant-garde important dans la protection, la sélection, l'intensification de la production animale et la préservation de sa qualité.

Fer de lance pour la sauvegarde du cheptel, cette discipline est conçue pour intervenir directement dans la lutte contre les maladies et les épidémies ainsi que dans le développement de nouvelles technologies en matière de conduite d'élevage. Elle est désormais dotée d'un dispositif bien agencé assurant la reconnaissance épidémiologique, la prévention contre les principales maladies animales contagieuses et leur contrôle sanitaire.

Les avortements sont des pathologies anciennes et persistantes en élevage ovin. Tous les élevages, quelque soit leur type de production, connaissent des avortements. L'avortement se définit comme l'expulsion d'un fœtus mort ou qui ne survit que quelques heures. Il peut être précoce et non visible pour l'éleveur, on parle ainsi d'infertilité ou de mortalité embryonnaire (Brugère-Picoux, 2011).

Parmi toutes les causes d'avortements, celles d'origine infectieuse sont les plus redoutables parce qu'elles sont contagieuses et douées d'un grand pouvoir de propagation au sein et parmi les élevages. Ce sont des maladies souvent difficiles à combattre en raison des échecs thérapeutiques. De plus, elles sont persistantes par le biais d'animaux porteurs asymptomatiques et excréteurs. Par ailleurs, ces infections abortives sont parfois transmissibles à l'homme comme la brucellose, la chlamydie, la fièvre Q, la listériose, la campylobactériose dont certaines sont particulièrement dangereuses pour la femme enceinte et les personnes présentant un déficit immunitaire (Guerin, 2004).

En Algérie, l'avortement enzootique des brebis s'inscrit dans la liste des maladies animales à déclaration obligatoire. Causée par *Chlamydia abortus* (*C. abortus*), c'est l'affection bactérienne la plus redoutée des éleveurs en cas d'avortements.

Cette infection bactérienne de la reproduction est à l'origine d'avortement enzootique tardif, d'infertilité, de mortinatalité chez les ruminants mais aussi de pathologies qui réduisent sensiblement la rentabilité des élevages (pneumonie, conjonctivite, arthrite, épидидymite). Elle est également transmissible à l'homme et à l'origine de problèmes de santé publique. Des femmes enceintes participant à l'agnelage se sont contaminées et ont avorté avec des complications sévères (Souriau *et al.*, 1996).

En dépit des pertes directes et indirectes occasionnées par l'avortement enzootique des brebis, très peu d'études ont été réalisées à l'échelle nationale afin de dresser le portrait épidémiologique vis-à-vis de cette infection. A notre connaissance, aucune étude moléculaire de *C. abortus* n'a été réalisée jusqu'à présent.

Il en ressort alors que la prévalence de l'infection et sa place parmi d'autres infections abortives chez les brebis demeure inconnue dans la zone d'étude. Les facteurs de risque d'apparition de l'infection dans les élevages ovins n'ont pas été définis. Par ailleurs, aucune recherche n'a été encore entamée, à ce jour, concernant la séquence nucléotidique des souches de *C. abortus* sévissant dans le pays.

Tout au long de cette recherche, afin d'atteindre les buts et objectifs escomptés, une priorité est donnée pour l'aboutissement à des résultats qui doivent mettre en exergue les démarches à entreprendre pour éclairer sur la prévalence de certaines infections de la reproduction au moyen de procédés efficaces telle la sérologie.

Le présent travail de recherche, se propose d'établir le statut immunitaire des brebis de la wilaya de Constantine vis-à-vis de cinq maladies abortives. Ainsi, la brucellose, la fièvre Q, la chlamydiose, la salmonellose abortive et la néosporose ont été choisis en fonction des outils de diagnostic de laboratoire disponibles, en raison de leur impact économique et hygiénique.

Dans cette optique, une attention particulière est accordée à l'aspect épidémiologique de l'avortement enzootique des brebis par la détermination de la prévalence des anticorps dirigés contre *C. abortus* et la recherche des facteurs de risque associés à cette infection durant la période s'étalant de mars 2011 à janvier 2012.

L'apport des outils de biologie moléculaire à savoir la PCR-RFLP et le séquençage de l'acide nucléique bactérien dans le diagnostic et la caractérisation moléculaire de *C. abortus* sur des tissus fœtaux et placentas ovins sont analysés. Une étude histologique de placentas de brebis avortées est exposée.

Cette thèse comporte deux grandes parties :

La première partie est une revue de littérature sur l'épidémiologie, la pathogénie, le tableau clinique et lésionnel, les outils diagnostiques, les traitements et les préconisations de prophylaxie sanitaire de l'avortement enzootique des brebis. Par ailleurs, l'utilité de la prophylaxie médicale, la conduite à tenir lors d'atteinte d'un troupeau et les mesures à instaurer afin d'éviter la contamination de l'environnement et des élevages voisins ainsi que le risque de transmission à l'homme sont exposés. D'autre part, le diagnostic différentiel des avortements infectieux chez la brebis est présenté avec l'accent mis sur la brucellose, la fièvre Q, la salmonellose abortive et la néosporose.

La deuxième partie est une étude expérimentale regroupant quatre chapitres :

1. Dépistage sérologique des infections abortives chez les brebis dans la wilaya de Constantine : chlamydie, fièvre Q, brucellose, salmonellose abortive et néosporose.
2. Séroprévalence et facteurs de risque associés à l'infection par *Chlamydia* spp. chez les brebis dans la wilaya de Constantine.
3. L'avortement enzootique des brebis : Prévalence et facteurs de risque associés à l'infection des brebis par *Chlamydia abortus* dans la wilaya de Constantine
4. Caractérisation moléculaire de *Chlamydia abortus* par PCR-RFLP à partir de prélèvements de tissus fœtaux et de placentas ovins.

Première partie

Revue de littérature

Chapitre I

Epidémiologie de l'avortement enzootique des brebis

1. Définition

L'avortement enzootique des brebis est dû à une petite bactérie à Gram négatif nommée *Chlamydia abortus* (*C. abortus*), anciennement appelée *Chlamydia psittaci* sérotype 1. Il s'agit d'une bactérie intracellulaire obligatoire, difficile à isoler car elle ne se multiplie que dans les vacuoles cytoplasmiques des cellules eucaryotes. Le cycle de multiplication de *Chlamydia* spp. fait alterner deux formes : une petite forme extracellulaire ou corps élémentaire (EB) mesurant 200 à 300 nm, infectieux, métaboliquement inactif et résistant dans le milieu extérieur (Rodolakis, 2006), et une grosse forme intracellulaire ou corps réticulé (RB) (500-1600 nm), non infectieux, métaboliquement actif et sensible à certains antibiotiques (Aitken, 2000 ; Entrican *et al.*, 2001 ; Nietfeld, 2001 ; Andersen, 2004 ; Rekiki, 2004 ; Thomson *et al.*, 2005 ; Rodolakis, 2006 ; Caro *et al.*, 2009).

2. Synonymie

L'avortement enzootique des brebis [de l'anglais Enzootic Abortion of Ewes (EAE)], est aussi nommé chlamydie abortive ovine ou chlamydophilose.

3. Espèces affectées

Chlamydia abortus est à l'origine d'avortements enzootiques tardifs et mortinatalités principalement chez les petits ruminants (moutons et chèvres) et plus rarement les bovins, les chevaux ou les cervidés. Elle est également transmissible à l'Homme (Brugère-Picoux, 2011).

4. Historique des chlamydies

Les premières descriptions des maladies causées par les chlamydies remontent à l'antiquité. Le trachome a été relaté dans des écrits chinois et des papyrus égyptiens (Ebers papyrus) 1500 ans avant Jésus-Christ (Rodolakis et Yousef Mohamad, 2010).

Soixante ans après Jésus-Christ, Pénadius Dioscorides, un médecin sicilien, a utilisé pour la première fois le terme « trachome » (Thygeson, 1962).

A la fin du 18^{ème} siècle, la lymphogranulomatose vénérienne (LGV) a été décrite par John Hunter (de Barbeyrac *et al.*, 1997).

Au début du 19^{ème} siècle, un lien fut suspecté entre une infection affectant des psittacidés et des cas de pneumonie chez les personnes ayant eu contact avec des oiseaux exotiques (Rodolakis et Yousef Mohamad, 2010). En 1895, Morange propose pour ce type d'infection le nom de « psittacose » (Morange, 1895). En 1907, Halberstädter et Von Prowasek ont mis en évidence pour la première fois des inclusions basophiles intra cytoplasmiques chez des patients atteints de trachome. Pensant qu'ils étaient en présence de protozoaires, ils les appelèrent « Chlamydozoon » du grec Chlamus qui signifie « manteau », indiquant la manière dont le micro-organisme est présent dans une cellule (Halberstadter et von Prowazek, 1907). Ce n'est que 23 ans plus tard que l'agent causal a été isolé par Levinthal dans des tissus infectés de perroquets, lors d'une pandémie de plusieurs centaines de cas humains causée par des perroquets argentins infectés entre 1929 et 1930 en Europe et aux États-Unis. Presque simultanément, Coles et Lillie ont décrit de minuscules corps sphériques basophiles dans des cellules humaines et d'oiseaux infectés (Rodolakis et Yousef Mohamad, 2010).

Bedson *et al.* (1930) et Miyagawa (1935a-d) ont successivement cultivé sur œufs embryonnés l'agent responsable de LGV et celui de la pandémie de psittacose de 1929-1930.

En 1934, Thygeson, un ophtalmologiste a établi un lien entre la morphologie des inclusions observées dans le trachome chez l'Homme et celle de la psittacose chez les oiseaux. Une similitude dans le cycle de développement de ces agents a été constatée mais ce n'est qu'en 1941 que le lien entre les agents du trachome, de la conjonctivite à inclusions, de la LGV et de la psittacose fut établi. Galen, a décrit les quatre stades de la maladie (Thygeson, 1962).

McNutt et Waller (1940) ont détecté des corps élémentaires de chlamydies dans les cerveaux de bovins suite à des cas sporadiques d'encéphalomyélite. Des EBs ont été détectés aussi dans les poumons de souris (Gönnert, 1941) et de chats souffrant de pneumonie (Baker, 1944).

L'avortement à *Chlamydia* a été décrit pour la première fois par Greig en 1936 et a été nommé avortement enzootique ovin (OEA). Il suggéra à l'époque que l'avortement était le résultat de facteurs environnementaux et d'une carence alimentaire. A partir de 1950, l'équipe de Stamp a démontré que les chlamydies causaient l'avortement chez les petits ruminants (Stamp *et al.*, 1950). Tang *et al.* (1957) réussissent l'isolement de la bactérie sur les embryons de poulet. Gordan et Quan (1965a) décrivent plus tard une technique d'isolement de l'agent du trachome, sur les cellules McCoy.

La nature des chlamydiae n'a été élucidée que vers la fin des années 1960. Ces agents ont été initialement considérés comme des virus à cause de leur petite taille et de leur multiplication stricte à l'intérieur des cellules hôtes (Rhodes et Van Rooyen, 1962), puis comme un intermédiaire entre bactérie et virus (Bernkopf *et al.*, 1962).

En 1966, Moulder a finalement prouvé qu'il s'agissait d'une bactérie. Ces agents possèdent plusieurs caractéristiques communes aux bactéries : elles conservent leurs propriétés cellulaires à travers un cycle de croissance, se développent dans les vacuoles cytoplasmiques et se divisent par fission binaire analogue à celle des bactéries. Les EBs et RBs contiennent de l'ARN et de l'ADN. Le cytoplasme est entouré d'une enveloppe cellulaire dépourvue de peptidoglycane. Elles sont aussi sensibles aux antibiotiques (Moulder, 1966).

5. Importance de la chlamydie abortive ovine

La large distribution de la chlamydie abortive en a fait un problème mondial. L'importance de l'avortement enzootique au sein d'un élevage ovin est liée à trois points : santé animale, santé publique ainsi qu'à son impact économique.

5.1. Santé animale

C. abortus possède une affinité pour le placenta. Elle est à l'origine d'avortements tardifs, de mortinatalités et de naissance de produits chétifs chez les ruminants tout particulièrement chez les brebis. Elle est responsable également d'arthrites, conjonctivites, pneumonies. C'est l'affection bactérienne la plus redoutée des éleveurs en cas d'avortement en raison de son aspect enzootique. En effet, l'apparition de la maladie dans un élevage se traduit par des avortements massifs pouvant atteindre 30 % des brebis gestantes (Souriau *et al.*, 1996). La primo-infection induit chez l'animal une forte immunité qui permet d'éviter d'autres avortements lors des gestations suivantes. Les femelles issues de brebis infectées peuvent cependant devenir infectées latentes, excréter des bactéries ultérieurement ou exprimer les signes de l'avortement enzootique si elles sont gardées pour la reproduction (Kadra et Balla, 2006). Bien que non prouvé cliniquement, des études expérimentales indiquent que *C. abortus* pourrait être la cause d'infertilité (Nietfield, 2001). Des résorptions fœtales ou des infertilités indéterminées passent souvent inaperçues. La bactérie est aussi responsable de l'inflammation des testicules, des vésicules séminales, de l'épididyme ; entraînant une contamination de la semence (Appleyard *et al.*, 1985 ; Papp et Shewen, 1996a ; Rodolakis *et al.*, 1998).

5.2. Santé publique

La chlamydiae ovine est transmissible à l'homme, quoi qu'elle a été longtemps négligée et peu souvent diagnostiquée puisqu'elle passe souvent inaperçue ou est confondue avec une infection respiratoire bénigne (Rodolakis, 2006). Cependant, l'implication de cette infection a été démontrée dans de nombreux problèmes de santé publique notamment les avortements chez les femmes enceintes avec parfois des complications, des pneumonies sévères, etc. (Aitken, 2000).

5.3. Impact économique

La chlamydophilose revête une grande importance du point de vue économique. Les pertes économiques lourdes occasionnées par *C. abortus* sont représentées par : les avortements deux à trois semaines avant la date présumée de l'agnelage, la baisse de prolificité, l'hypofertilité et la naissance à terme d'agneaux mort-nés ou encore chétifs, difficiles à élever.

La chlamydophilose est la première cause de mortalité des agneaux au Royaume-Uni (Longbottom *et al.*, 2013). Les pertes liées à la chlamydophilose ont été estimées à près de £20 millions chaque année (Stuen et Longbottom, 2011). En somme, ces pertes sont liées à la non vente du produit (agneau), le non renouvellement des jeunes reproductrices (antennes), la diminution de la quantité de lait produite, le risque de contamination de plusieurs lots dans l'élevage en plus des entraves aux échanges commerciaux d'animaux et de produits dérivés.

C. abortus est aussi responsable de pathologies qui diminuent la rentabilité des élevages : pneumonie, conjonctivite, arthrite, épидидymite, etc.

Les effets indirectes de l'infection sur les productions animales sont représentés par le coût des interventions vétérinaires et de la reconstitution des cheptels (Rekiki *et al.*, 2005).

6. Aspects relatifs à la santé publique

L'infection de l'Homme par *C. abortus* est fréquemment associée à des maux de tête accompagnés de fièvre et de toux (Rodolakis, 2006). Les femmes enceintes sont particulièrement à risque lorsqu'elles sont exposées à *C. abortus* lors d'agnelages ou d'avortements. Pouvant être contaminées, la colonisation du placenta par la bactérie conduira à un avortement et/ou une mortinatalité accompagné de complications sévères parfois mortelles comme l'insuffisance rénale aiguë, la coagulation intra vasculaire disséminée, la thrombopénie, l'atteinte myocardique ou une détresse respiratoire nécessitant une ventilation mécanique (Giroud *et al.*, 1956 ; Roberts *et al.*, 1967 ; Crosse *et al.*, 1971 ; Terskikh *et al.*, 1977 ; Beer *et al.*, 1982 ; Wong *et al.*, 1985 ; Buxton, 1986 ; Pospischil *et al.*, 2002 ; Longbottom et Coulter, 2003).

Quelques cas d'avortements à *C. abortus* de femmes ayant eu un contact étroit avec les petits ruminants, ont été décrits dans de nombreux pays : Royaume-Uni (Hadley *et al.*, 1992), Pays-Bas (Kampinga *et al.*, 2000), Suisse (Pospischil *et al.*, 2002), États-Unis (Hyde *et al.*, 1997). Les avortements par *C. abortus* ont été aussi signalés dans de nombreux pays tropicaux comme la Namibie (Samkange *et al.*, 2010) et l'Inde (Mani *et al.*, 2011).

La transmission de l'infection chez l'Homme se fait en général par l'inhalation d'aérosols infectés et se manifeste souvent par un syndrome grippal (Dubreuil et Arsenault, 2003). Des troubles respiratoires notamment des pneumonies atypiques faisant suite à une contamination au laboratoire sont aussi possibles. *C. abortus* peut être également à l'origine d'arthrites et de conjonctivites (Rodolakis *et al.*, 1998 ; Nietfeld, 2001 ; Entrican *et al.*, 2001 ; Andersen, 2004).

L'incidence de la chlamyphilose chez l'Homme est inconnue, car elle est asymptomatique dans un grand nombre de cas, ou facilement confondue avec une grippe (Rodolakis, 2006).

7. Épidémiologie descriptive

La prévalence de l'avortement enzootique des brebis est très variable dans les différents pays. Dans la plupart des enquêtes épidémiologiques, la prévalence varie de 5 à 39 % (Al-Qudah *et al.*, 2004 ; Borel *et al.*, 2004). Dans une étude menée dans la région d'Alagoas au Brésil, 21,5% (59/274) des sérums testés sont positifs vis-à-vis de *C. abortus* (Pinheiro J *et al.*, 2010). La séroprévalence de la chlamydiose ovine a été estimée à 21,8 % en Jordanie (Al-Qudah *et al.*, 2004) et 19,6 % en Grèce (Bisias *et al.*, 2011). En Suisse, les anticorps dirigés contre *C. abortus* ont été retrouvés dans 19 % des 755 élevages ovins testés (Borel *et al.*, 2004). Les résultats d'une enquête menée en Slovaquie, s'étalant sur cinq années sur un effectif de 20 878 ovins ont révélés une prévalence de 11,7 % (Čisláková *et al.*, 2007). Une étude rétrospective entreprise en Italie a révélé une prévalence de 21 à 46,8 % (Masala *et al.*, 2005). Une étude épidémiologique réalisée en Espagne a révélé une séroprévalence de 50,5 % (Mainar-Jaime *et al.*, 1998).

Dans une enquête menée dans la région de Ksar Boukhari en Algérie, 10 ± 06 % des troupeaux ovins testés sont séropositifs vis-à-vis de *C. abortus* (Rahal *et al.*, 2011). *C. abortus* a été également recherchée dans les pays voisins du Maghreb. En effet, la prévalence de l'infection a été estimée à 21 % en Tunisie (Rekiki *et al.*, 2005) et 21,5 % au Maroc (Hamzy El Idrissi *et al.*, 1995).

La chlamydie abortive est la principale cause d'avortement enzootique et de mortalité des agneaux au Royaume-Uni (Longbottom *et al.*, 2013). En effet, la chlamydie abortive ovine a été contrôlée avec succès vers les années 1960 et 1970 par l'emploi d'un vaccin à base d'une souche unique de *C. abortus* inactivée au formol et cultivée sur œufs embryonnés. L'immunité procurée a duré près de 3 années mais n'a pas fourni de protection complète contre l'infection ; la maladie commença à réapparaître en Écosse vers la fin des années 1970s puis s'est disséminée vers le reste du Royaume-Uni. Depuis, sa prévalence n'a cessé d'augmenter chaque année. En 1995, près de 1600 élevages ont connu des avortements par *C. abortus* en Angleterre, en Écosse et au pays de Galles. Il a été spéculé que de nouvelles souches plus virulentes ont émergé depuis les années 1970s ; expliquant l'inefficacité de la protection vaccinale (EBI, 2010). Des études ont incriminé *C. abortus* dans 44 % des cas d'avortements infectieux (Stuen et Longbottom, 2011). Les pertes économiques sont estimées de £6 à £20 millions chaque année (Milne *et al.*, 2009 ; Stuen et Longbottom, 2011). Par ailleurs, *C. abortus* est la cause la plus fréquente d'avortement en Amérique du nord. Elle a été associée à des cas de pneumonie, conjonctivite, épидидymite et arthrite chez les caprins (Leite-Browning, 2006).

8. Epidémiologie analytique

8.1. Taxonomie des *Chlamydiae*

De nombreuses appellations ont désigné les chlamydies. Elles ont été tout d'abord nommées les agents du groupe de PLT (Psittacosis, Lymphogranuloma venereum, Trachoma). En 1948, les souches de *Chlamydiae* ont été classées sous l'ordre des *Rickettsiales* et la famille des *Chlamydozoceae* qui comprenait trois genres : *Chlamydozoon*, *Myagawanella* et *Colesiota* (Rodolakis et Youcef Mohamad, 2010). Vingt années plus tard, de nouvelles classifications furent proposées presque chaque année jusqu'à ce que Storz et Page (1971) suggèrent de classer les *Chlamydiae* sous un nouvel ordre, celui des *Chlamydiales* regroupant un seul genre (*Chlamydia*). Les bactéries de ce genre sont caractérisées par un cycle de développement intracellulaire obligatoire unique. *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci* furent les deux premières espèces assignées au genre *Chlamydia* (Page, 1968). La distinction des deux espèces est basée sur les différences de sensibilité aux sulfamides et le contenu de l'inclusion en glycogène, conduisant à des différences de coloration à l'iode (Gordon et Quan, 1965b; Page, 1966). *Chlamydia trachomatis* regroupant toutes les souches humaines et celles provoquant la pneumonie chez la souris sont sensibles aux sulfamides, accumulent le glycogène dans l'inclusion colorée à la solution d'iode.

L'espèce *Chlamydia psittaci* regroupe des souches très différentes : les souches aviaires très homogènes entre elles, les souches des ruminants très hétérogènes ainsi que des souches isolées de porc, cobaye, chat et chien. Celles-ci sont résistantes aux sulfamides et sont négatives à la coloration à l'iode (Storz, 1971 ; Moulder, 1982).

En 1987, une nouvelle souche de *Chlamydiae* (TWAR) a été isolée de l'Homme puis nommée *Chlamydia pneumoniae* (Grayston *et al.*, 1989).

Plusieurs études ont été menées pour classer les souches de *Chlamydia psittaci* d'après leur hôte, propriétés morphologiques, différences antigéniques ou de virulence et leurs différences génomiques (Rodolakis *et al.*, 1989 ; Yousef Mohamad, 2009).

Schachter et ses collaborateurs ont divisé les souches de *C. psittaci* isolées des ruminants en deux sérotypes : le sérotype 1 contient les souches provoquant l'avortement et les entérites, et le sérotype 2 contient les souches responsables de polyarthrite et de conjonctivite (Schachter *et al.*, 1974; Schachter *et al.*, 1975).

Souriau *et al.* (1993) utilisèrent la MIF (micro-immunofluorescence) pour diviser les souches isolées des ruminants en deux sérotypes : le sérotype 1 qui contient les souches isolées d'avortements et le sérotype 2 regroupant les souches intestinales.

Une quatrième espèce de la famille des *Chlamydiaceae* a été proposée et désignée sous la dénomination de *Chlamydia pecorum* (Fukushi et Hirai, 1992 ; Fukushi et Hirai, 1993).

L'emploi des séquences nucléotidiques des ARN ribosomiaux (16S et 23S) a changé la taxonomie des *Chlamydiae* (Yousef Mohamad, 2009). L'analyse de l'espace inter-génique 16S-23S et du domaine I du gène codant pour l'ARNr 23S a abouti à deux groupes : le premier correspondant à *C. trachomatis* et le second aux trois autres espèces, avec 9 groupes génétiques distincts (Everett et Andersen, 1997 ; Youcef Mohamad, 2009).

Ainsi, une nouvelle classification a été proposée (Everett *et al.*, 1999). Sous l'ordre des *Chlamydiales*, 4 familles sont distinguées : *Chlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Parachlamydiaceae* et *Simkaniaceae*, comprenant 6 genres et 13 espèces. La famille des *Chlamydiaceae* regroupe 2 genres (*Chlamydia* et *Chlamydophila*) et 9 espèces. Le genre *Chlamydia* comprend 3 espèces : *Chlamydia trachomatis*, responsable essentiellement d'infections oculaires et génitales chez l'Homme, *Chlamydia suis* anciennement les souches de *C. trachomatis* d'origine porcine et *Chlamydia muridarum* regroupant les souches de *C. trachomatis* isolées de la souris et du

hamster. Le genre *Chlamydomphila* comporte 6 espèces: *Chlamydomphila pecorum*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci* d'origine aviaire, *Chlamydomphila caviae* (anciennes souches de *C. psittaci* isolées des cobayes), *Chlamydomphila felis* (anciennes souches de *C. psittaci* isolées des chats) et *Chlamydomphila abortus* anciennement *C. psittaci* isolée d'avortements chez les ruminants.

Une grande partie de la communauté scientifique, notamment les chercheurs dans le domaine vétérinaire adoptent la classification citée ci-dessus malgré que des scientifiques reprochent à la nouvelle classification la création de 2 genres et de se baser essentiellement sur des différences de séquences nucléotidiques minimales pour une sélection inter-espèces de *Chlamydiae* (Entrican *et al.*, 2010). Depuis août 2011, un seul genre a été proposé. Le genre *Chlamydia* regroupe actuellement les 9 espèces de la famille des *Chlamydiaceae* (Stephens *et al.*, 2009) (tableau 1).

Tableau 1 : Taxonomie des *Chlamydiae* (Wheelhouse et Longbottom, 2012)

Famille	Genre	Espèce	Hôte typique
Chlamydiaceae	<i>Chlamydia</i>	<i>C. trachomatis</i>	Homme
		<i>C. muridarum</i>	Souris, hamster
		<i>C. suis</i>	Porc
		<i>C. pneumoniae</i>	Homme, cheval, koalas
		<i>C. psittaci</i>	Oiseaux, volaille
		<i>C. abortus</i>	Ruminants, porcs
		<i>C. caviae</i>	Cobaye
		<i>C. felis</i>	Chats
		<i>C. pecorum</i>	Ruminants, porc, koalas
<i>Candidatus</i> Clavichlamydiaceae	<i>Candidatus</i> Clavichlamydia	<i>Candidatus</i> C. Salmonicola	Poissons Salmonidés (eau de rivière)
Criblamydiaceae	<i>Criblamydia</i>	<i>Criblamydia sequanensis</i> <i>Estrella lausannensis</i>	
Parachlamydiaceae	<i>Parachlamydia</i> <i>Neochlamydia</i> <i>Protochlamydia</i>	<i>P. acanthamoebae</i>	<i>Acanthamoeba</i>
		<i>N. hartmannellae</i>	<i>Hartmannella vermiformis</i>
		<i>Candidatus</i> P. ameobophila	<i>Acanthamoeba</i>
		<i>Candidatus</i> P. naegleriophila	<i>Naegleria amoeba</i>
<i>Candidatus</i> Piscichlamydiaceae	<i>Candidatus</i> Piscichlamydia	<i>Candidatus</i> Piscichlamydia salmonis	Saumon atlantique d'élevage
Rhabdochlamydiaceae	<i>Rhabdochlamydia</i>	<i>Candidatus</i> R. crassificans	Arthropodes
		<i>Candidatus</i> R. porcellionis	
Simkaniaceae	<i>Simkania</i> <i>Candidatus Fritschea</i>	<i>S. negevensis</i> <i>Candidatus</i> F. eriococci <i>Candidatus</i> F. bemisiae	Insectes
Waddliaceae	<i>Waddlia</i>	<i>W. chondrophila</i>	Bovins
		<i>W. malaysiensis</i>	Chauve-souris

8.2. Caractères généraux des chlamydies

8.2.1. Caractères bactériologiques

L'ordre des *Chlamydiales* rassemble des bactéries intracellulaires obligatoires qui se multiplient dans les cellules eucaryotes par un cycle particulier, impliquant une forme infectieuse (EB), et une forme de multiplication (RB). La famille des *Chlamydiaceae* regroupe neuf espèces qui présentent une similitude de séquence des ARNr 16s supérieure à 90 % avec la souche de référence B577 (*Chlamydia abortus*) (Sebbag, 2011). Ce sont des bactéries à Gram négatif, ayant besoin de l'ATP d'origine cellulaire pour croître. Les chlamydies sont des procaryotes contenant de l'ADN et de l'ARN dans leur cytoplasme, ce dernier est entouré d'une paroi proche de celle des bactéries à gram négatif. Les chlamydies ne possèdent ni de flagelles, ni de pili.

8.2.2. Structure physique et chimique

8.2.2.1. Les corps élémentaires (EBs)

Les EBs sont grossièrement sphériques mesurant de 200 à 300 nm de diamètre, et renferment un nucléoïde excentré composé d'ADN double brin d'environ 1 mégabases et de nombreux ribosomes. Ils sont entourés d'une paroi rigide, proche de celle des bactéries à Gram négatif, constituée d'une membrane externe contenant du lipopolysaccharide (LPS) et d'une membrane interne. Toutefois, contrairement à la paroi des bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est absent, même si certains des gènes impliqués dans la synthèse de cette molécule sont présents dans le génome. Le LPS, d'un poids moléculaire d'environ 10 kDa, présente des analogies structurales et antigéniques avec le LPS des mutants Re des entérobactéries (la fraction polysaccharidique du LPS des mutants Re ne contient que de l'acide 3-desoxy-D-manno-octulosonique). La membrane externe renferme plusieurs protéines riches en résidus cystéine : la protéine majeure de membrane externe (Major Outer Membrane Protein ou MOMP) d'un poids moléculaire d'environ 40 kDa (Caldwell et Judd, 1982 ; Wyllie *et al.*, 1998), la protéine omp2 (ou env B) de 60 kDa et la lipoprotéine omp3 (ou env A) de 15 kDa. Les ponts disulfures qui s'établissent entre ces protéines assurent la rigidité de la paroi et expliquent la résistance des corps élémentaires aux facteurs mécaniques et aux chocs osmotiques (Bavoil, 1984 ; Hackstadt, 1985). La MOMP présente sous une forme polymérisée, est constituée de 4 domaines variables hydrophiles encadrés par 5 domaines constants hydrophobes. Les domaines variables sont exposés en surface alors que les domaines constants sont enchâssés dans la membrane.

La MOMP comporte un glycane constitué de huit à neuf molécules de mannose, qui joue un rôle dans son adhésion aux cellules et ses capacités invasives (De Sa, 1996). C'est une protéine de type porine dont l'activité porine est considérablement augmentée par réduction (De Sa, 1996).

En position intracellulaire, les ponts disulfures de la membrane externe sont réduits ce qui augmente la perméabilité (formation des pores) et permet la transformation des corps élémentaires en corps réticulés aptes à incorporer les nutriments cellulaires. Un composant de type aminoglycane est présent à la surface des corps élémentaires et pourrait jouer un rôle dans l'attachement aux récepteurs cellulaires. L'adhésion est également sous la dépendance de la MOMP dont les domaines variables permettent des interactions de type électrostatique et hydrophobe.

8.2.2.2. Les corps réticulés (RBs)

Ils sont de taille plus importante que les EBs (0,8 à 1,0 μm) et constituent la forme proliférative de la bactérie. Les RBs ont un aspect réticulé homogène et sont limités par une paroi mince et flexible au sein de laquelle la MOMP est sous forme monomérique (Chiappino *et al.*, 1995). Ce sont la forme métaboliquement active de *Chlamydia* et contiennent une quantité d'ARN trois fois supérieure à celle des EBs, nécessaire pour la synthèse des protéines et des phospholipides (Hatch, 1999). Ils sont caractérisés par une décondensation du nucléoïde et un grand nombre de ribosomes. Ils ne possèdent ni système de transport des électrons ni de cytochrome et ils sont incapables de synthétiser de l'ATP et du GTP. Une fois mature, les corps réticulés se multiplient de façon exponentielle et donnent naissance à une progénie infectieuse de plus de 1000 bactéries par cellule hôte (Jungas, 2005).

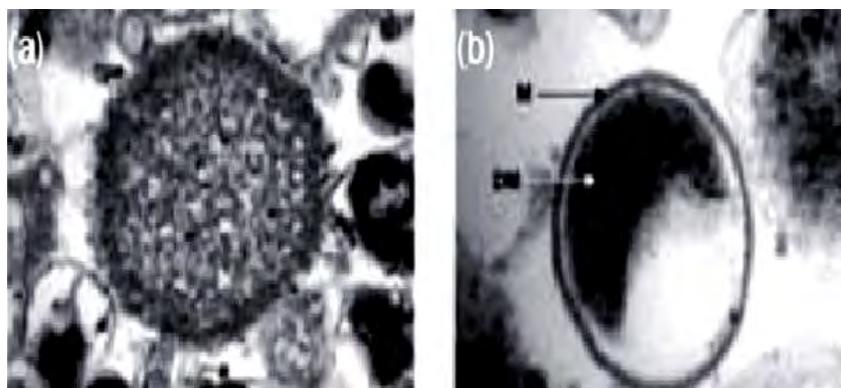


Figure 1 : Microscopie électronique en transmission purifiée (Williams *et al.*, 2008)
 (a) corps réticulé (barre d'échelle, 500 nm) et (b) corps élémentaire (barre d'échelle, 200 nm).
 Les EBs sont caractérisés par une masse centrale dense (DM), une membrane externe et une membrane cytoplasmique (M).

8.2.3. Cycle de développement

Les chlamydies envahissent préférentiellement les cellules épithéliales des muqueuses, les macrophages, les cellules endothéliales et certaines cellules musculaires (Jungas, 2005). Ces bactéries possèdent un cycle de développement unique et complexe avec passage d'une forme à l'autre (EB et RB).

L'infection des cellules hôtes débute par l'adhésion des EBs à leur cellule cible par un mécanisme similaire à l'endocytose médiée par des récepteurs (Hodinka et Wyrick, 1986 ; Ward, 1988 ; Rockey et Matsumoto, 2000). Suite à cet attachement, les corps élémentaires sont internalisés dans la cellule via un endosome par un mécanisme encore mal caractérisé (Hackstadt, 1999 ; Wyrick, 2000). L'ingestion fait intervenir deux facteurs: l'activation d'une lysolécithine qui favoriserait l'entrée des EBs par accroissement de la fluidité membranaire, et la GMP cyclique qui accroîtrait l'aptitude de la membrane cellulaire à fusionner avec la membrane du EB pour former une vacuole cytoplasmique (Eissenberg, 1981 ; Jungas, 2005). La vacuole parasitophore, également dénommée « inclusion », ne fusionne en aucun moment avec les lysosomes, mettant ainsi les chlamydies à l'abri de l'activité bactéricide de la cellule hôte (Jungas, 2005).

Après deux heures de leur internalisation, les EBs se différencient en RBs. Ce processus fait intervenir la synthèse de protéines par *Chlamydia*, la réduction et le clivage de ponts disulfures, la mise en place de systèmes de transport afin de se procurer les nutriments et les métabolites depuis la cellule hôte et l'activation d'une adénosine triphosphatase (Jungas, 2005). Ces RBs se divisent alors rapidement par fission binaire.

Environ 24 à 48 heures après l'infection, selon les espèces, l'ADN chromosomal au sein des RBs se condense pour former le nucléoïde des EBs. L'activité transcriptionnelle des bactéries diminue et les protéines de la membrane externe se lient entre elles pour former des ponts disulfures (Jungas, 2005). La différenciation des RBs en EBs est asynchrone et les deux formes de la bactérie peuvent être retrouvées au sein de l'inclusion. Cependant, au bout de 40 heures, l'ensemble des corps présents dans cette vacuole sont essentiellement des EBs néoformés. Cette vacuole peut alors contenir près d'un millier de formes bactériennes infectieuses et son volume occupe la quasi-totalité du cytoplasme de la cellule hôte, repoussant le noyau à la périphérie de la cellule infectée.

Les EBs sont libérés par la lyse de la cellule hôte ou extrusion de l'inclusion de la cellule hôte. Ils sont ensuite capables d'infecter de nouvelles cellules soit dans le même hôte ou dans un nouvel hôte (Aitken, 2000).

Des infections persistantes induites par des stimuli externes peuvent se produire. Dans ce cas, les corps réticulés ne se redifférencient pas en corps élémentaires, mais se développent en organismes aberrants (ABs) avec une morphologie sensiblement modifiée. Les bactéries restent métaboliquement actives, mais sont incapables d'établir une infection productive. Par ce moyen, les *Chlamydiae* sont inaccessibles au système immunitaire de l'hôte et peuvent survivre pendant longtemps. Si le stimulus est enlevé, les bactéries seront réactivées et continueront leur cycle de développement (Stephens, 2003; Hogan *et al.*, 2004; Goellner *et al.*, 2006).

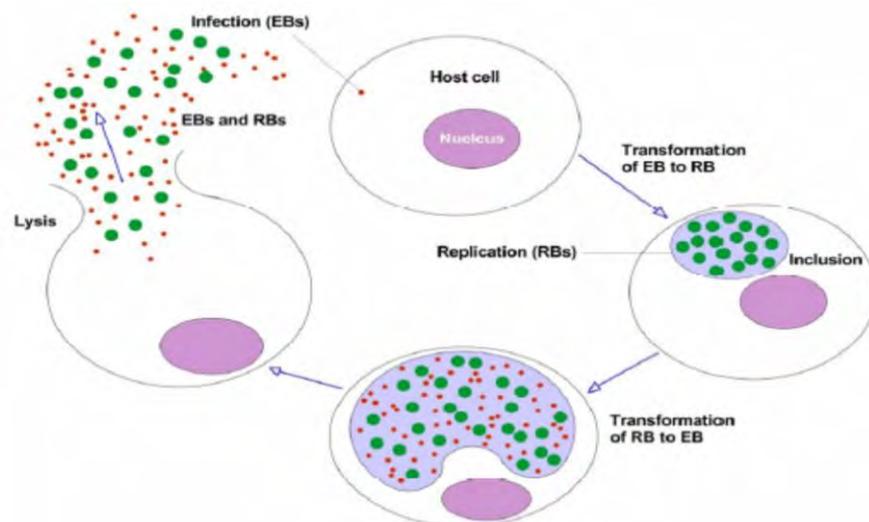


Figure 2 : Cycle de développement des *Chlamydiae* (Caro *et al.*, 2009)

8.2.4. Biochimie et métabolisme

Comme les chlamydies ne se cultivent pas sur milieu acellulaire, l'appréciation des caractères biochimiques d'identification reste difficile. Le RB bien que métaboliquement actif doit se procurer son énergie à partir des mitochondries, contre lesquelles il plaque son endosome (André, 1994).

8.3. Caractères antigéniques des *Chlamydiae*

Sur le plan antigénique, les chlamydies possèdent trois types d'antigènes : des antigènes de famille, des antigènes d'espèce et des antigènes spécifiques d'immunotypes (Sebbag, 2011).

8.3.1. Les antigènes de famille

Ces antigènes sont communs à toutes les espèces de la famille des *Chlamydiaceae*. Ils peuvent être portés par le LPS ou par des antigènes protéiques, thermolabiles dont la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) possédant une spécificité d'espèce ou de types sérologiques. 18 types sérologiques sont décrits chez *Chlamydia trachomatis* (A à K, L1-3) (Flandrois, 2000).

Le trisaccharide α Kdo-(2 \rightarrow 8)- α Kdo-(2 \rightarrow 4)- α Kdo est le principal antigène commun à toutes les espèces de la famille des *Chlamydiaceae* (Brade *et al.*, 2000). C'est l'antigène utilisé dans la réaction de fixation du complément et dans certains tests d'immunofluorescence et des tests immunoenzymatiques (Rodolakis, 1998).

8.3.2. Les antigènes d'espèce

Ils sont portés par le LPS et par la MOMP (De Sa, 1996 ; Rodolakis, 1998) et peuvent être mis en évidence par des techniques immunoenzymatiques ou par immunofluorescence directe par l'usage d'anticorps monoclonaux. Après absorption des anticorps reconnaissant le LPS, les antigènes d'espèce peuvent également être révélés par fixation du complément.

8.3.3. Les antigènes spécifiques d'immunotypes

Ceux-ci permettent de définir au moins 8 sérovars chez *Chlamydia psittaci* et 18 sérovars chez *Chlamydia trachomatis* (Sebbag, 2011).

8.4. Résistance

Les chlamydies sont sensibles à la plupart des désinfectants et des détergents, y compris une dilution 1:1000 des composés d'ammonium quaternaire, 1% d'hypochlorite de sodium, l'éthanol à 70 %, le glutaraldéhyde et le formaldéhyde (Longbottom et Coulter, 2003). Elles peuvent être détruites par la chaleur humide (121° C pendant un minimum de 15 minutes) ou à la chaleur sèche (160-170° C pendant 1 heure ou plus). Elles sont par contre résistantes aux acides et alcalins. Ces bactéries perdent leur pouvoir infectieux en 48 heures à température ambiante (Blanchart, 1994), mais peuvent conserver leur pouvoir infectieux plusieurs mois dans les selles et les sécrétions (André, 1994).

8.5. Excrétion de *C. abortus* et sources potentielles d'infection

Selon Wilsmore *et al.* (1984), l'environnement contaminé autour de l'agnelage constitue la source d'infection majeure pour les brebis et les agnelles non préalablement exposées à *C. abortus*. Aitken et Longbottom (2007), estiment que la contamination environnementale, pendant l'agnelage, par les chlamydies excrétées dans le placenta et les produits du part constituent la source majeure de transmission de l'infection aux animaux naïfs.

L'importance de l'excrétion de *C. abortus* dans le placenta et les décharges utérines a été démontrée par de nombreux auteurs (Stamp *et al.*, 1950 ; Navarro *et al.*, 2004). Le niveau de contamination moyen d'un placenta de brebis avortée a été estimé à $6,7 \times 10^5$ corps élémentaires par gramme de cotylédon infecté (Johnson *et al.*, 1983). Une étude a même conclu à une contamination placentaire moyenne de $2,7 \times 10^7$ bactéries par microgramme de cotylédon infecté (Livingstone *et al.*, 2009). *C. abortus* peut persister au niveau de l'utérus gravide ou vide, avec des taux plus élevés en début de gestation (Michalopolou *et al.*, 2007 ; Livingstone *et al.*, 2009). L'excrétion vaginale peut commencer neuf jours avant et deux semaines après la mise bas chez la chèvre (Rodolakis, 2006). Chez la brebis, l'excrétion de *C. abortus* est massive dans le placenta et les eaux fœtales, au cours des deux jours qui suivent l'avortement (Chalmers *et al.*, 1976 ; Chalmers *et al.*, 1997 ; Philips et Clarkson, 2002 ; Bouakane *et al.*, 2005). L'excrétion de *C. abortus* persiste alors dans les sécrétions utérines pendant trois semaines (Papp et Shewen, 1996b ; Nietfeld, 2001), dans les fèces pendant deux mois (Becerra *et al.*, 1976), dans l'urine et le lait en faibles quantités (Rodolakis, 2000 ; Ongör *et al.*, 2004). Papp *et al.* (1998) estiment qu'après des avortements à *C. abortus*, les gestations et les agnelages suivants sont normaux mais les brebis excrètent les bactéries par leur tractus reproducteur pendant au moins 2,5 à 3 ans. Les conditions climatiques permettent aux formes élémentaires d'être infectantes pendant plusieurs jours, voire plusieurs mois si la température est proche de 0° C (Aitken, 2000). Une brebis infectée en fin de gestation peut ne pas exprimer de signes cliniques lors de la saison de mise bas en cours mais excréter tout de même *C. abortus* à la mise bas suivante (Rodolakis et Souriau, 1980 ; Wilsmore *et al.*, 1990 ; Aitken, 2000 ; Nietfeld, 2001 ; Rekiki, 2004 ; Bouakane *et al.*, 2005).

Ainsi, les brebis avortées ou mettant bas des produits morts nés ou encore viables en début de saison d'agnelage, représentent une source majeure d'infection pour les brebis qui n'ont pas encore mis bas (Storz, 1971 ; Rodolakis et Souriau, 1980 ; Livingstone *et al.*, 2009 ; Milne *et al.*, 2009).

D'autre part, les produits mâles issus de mères infectées peuvent être porteurs de *C. abortus* et excréter les *Chlamydiae* dans leur sperme (Rodolakis et Bernard, 1977). Les agnelles nées de brebis infectées sécrètent la bactérie dans les produits du part et pourront avorter à leur tour lors de leur première ou seconde saison de reproduction (Wilsmore *et al.*, 1990 ; Chalmers *et al.*, 1997 ; Aitken, 2000 ; Nietfeld, 2001 ; Philips et Clarkson, 2002).

Il a été rapporté que les béliers peuvent s'infecter et excréter des *Chlamydiae* dans leur semence après une lutte avec des brebis infectées (Papp et Shewen, 1997).

Les agnelles peuvent aussi s'infecter en période périnatale au contact de leur mère naturelle ou adoptive infectée. Ces agnelles constituent donc un réservoir infectieux car l'infection est latente et le titre en anticorps de ces agnelles est trop faible pour être détecté par les techniques de diagnostic usuelles (Wilsmore *et al.*, 1984 ; Chalmers *et al.*, 1997 ; Aitken, 2000). En effet, *C. abortus* pourrait subsister sous forme d'infection inapparente dans les tissus lymphoïdes d'un animal infecté (non gestante s'il s'agit d'une femelle), sous une forme immature ou peu, voire non-infectieuse suite à la mise en place d'un équilibre du type « hôte-parasite » (Storz, 1971 ; Entrican *et al.*, 2001). Les brebis cliniquement saines, infectées latentes sont ainsi des sources de contagion dans le même troupeau et entre les élevages.

8.6. Transmission de l'infection

En matière de chlamydie abortive ovine, la contagion a lieu le plus souvent par voie oro-nasale (Entrican *et al.*, 2001 ; Entrican, 2002 ; Aitken et Longbottom, 2007) :

8.6.1. Voie digestive

Pour *C. abortus*, la voie digestive par ingestion d'un placenta contaminé, d'eau ou d'aliments souillés, par léchage d'animaux contaminés par des tissus ou fluides placentaires serait la voie principale (McEwen *et al.*, 1951 ; Parker *et al.*, 1966 ; Wilsmore *et al.*, 1984 ; Dawson *et al.*, 1986 ; Rodolakis, 2006), les chlamydies colonisant les cryptes des amygdales (Jones et Anderson, 1988 ; Rodolakis, 2006). Si la voie digestive est une voie de pénétration importante, la voie respiratoire joue également un rôle important dans la transmission de l'infection.

8.6.2. Voie respiratoire

La transmission aérienne par inhalation d'aérosols contaminés par *C. abortus* dans les environnements d'élevage souillés au moment de l'avortement ou de mise bas joue un rôle majeur dans la propagation de l'infection (Wilsmore *et al.*, 1984 ; Jones et Anderson, 1988). La contamination par l'agent pathogène résulte d'un contact étroit avec une femelle avortée ou ayant mis bas. Les macrophages alvéolaires pulmonaires sont les cibles de l'infection.

8.6.3. Autres voies

C. abortus a pu être isolée à partir du sperme (Wilsmore *et al.*, 1984 ; Appleyard *et al.*, 1985). L'excrétion de *C. abortus* peut se produire après synchronisation des chaleurs au moment de l'ovulation, donc de saillie, ce qui rend la transmission vénérienne possible (Papp *et al.*, 1994). Même si la transmission vénérienne de l'infection est possible, elle ne joue pas un grand rôle dans l'épidémiologie de la chlamydiae (Rodolakis, 2006). Dans une étude menée en Suisse par Teankum *et al.* (2007) visant la recherche de *C. abortus* dans la semence et les organes génitaux des ruminants, *C. abortus* n'a été retrouvée que dans un seul prélèvement sur les 78 échantillons de sperme ovin testés par PCR. La transmission sexuelle semble disséminer beaucoup moins efficacement l'agent infectieux que l'excrétion au moment de l'avortement. Elle se traduit plutôt par des baisses de fertilité dues à des métrites et une absence de nidation de l'embryon (Rodolakis, 2006). Expérimentalement, la transmission sexuelle de *C. abortus* par insémination artificielle avec de la semence dans laquelle des *Chlamydiae* ont été ajoutées se traduit par des retours en chaleurs par défaut de nidation de l'embryon (Bowen *et al.*, 1978). L'inoculation intra vaginale des chlamydiae 6 semaines avant la saillie entraîne la naissance d'agneaux infectés, avec excrétion de *Chlamydiae* plutôt que des vagues d'avortements (Papp et Shewen, 1996a).

Il n'existe pas de preuve que *C. abortus* soit transmise par le lait ou le colostrum des brebis (Wilsmore, 1989 ; Venables *et al.*, 1989 ; Jones et Anderson, 1989 ; Thomas *et al.*, 1990). Des travaux anciens rapportent que chez certaines femelles, *C. abortus* pourrait être excrétée pendant plusieurs mois dans le lait. Cela n'a pas été confirmé dans les études récentes utilisant la PCR (Rodolakis, 2006). En Turquie, Öngör *et al.* (2004) ont recherché *C. abortus* par PCR dans 221 échantillons de lait mais n'ont noté sa présence que dans 3 échantillons seulement (1,5 %).

En absence d'études plus approfondies, le lait ne semble pas un bon prélèvement pour caractériser le statut sanitaire d'un troupeau vis-à-vis de la chlamydiae.

8.7. Sensibilité à l'infection

La sensibilité à l'infection varie en fonction de l'état physiologique de la brebis, ce qui influence l'expression de la maladie (Souriau *et al.*, 1996 ; Rodolakis, 2006). Les femelles non gravides sont moins sensibles que les femelles gestantes (Entrican *et al.*, 2010).

L'infection des animaux non gravides évolue le plus souvent vers la guérison avec protection. Quoique dans 15 à 20 % des cas, il y a avortement au cours de la gestation suivante (Souriau *et al.*, 1996).

L'infection en tout début de gestation passe souvent inaperçue. Papp *et al.* (1993) ont détecté par ultrasonographie, quatre cas de mortalité fœtale 15 et 55 jours après l'infection expérimentale de 19 brebis à 50 jours de gestation. Dans cette étude, aucune manifestation apparente n'a accompagné la mortalité fœtale. De même, l'infection expérimentale de quatorze brebis à 75 jours de gestation a donné des avortements au cours des trois dernières semaines de la gestation sans signes cliniques de la maladie à part une légère hyperthermie quelques jours suivant l'infection expérimentale (Navarro *et al.*, 2004). Des études expérimentales plus anciennes ont obtenu les mêmes résultats (Andreani *et al.*, 1987 ; Buxton *et al.*, 1990).

Une infection à mi-gestation provoque l'avortement alors qu'une contamination en fin de gestation entraîne le plus souvent la naissance prématurée ou à terme d'agneaux infectés qui pérennisent l'infection dans le troupeau ou d'agneaux chétifs difficiles à élever, qui peuvent souffrir d'arthrite, de pneumonie ou de conjonctivite (Souriau *et al.*, 1996).

8.8. Pathogénie de l'avortement enzootique des brebis

La contamination des brebis par *C. abortus* s'effectue par voie oro-nasale suite à l'ingestion de placentas contaminés, d'aliments et d'eaux souillés ou par contact étroit avec une brebis avortée ou les sécrétions vaginales du postpartum (Andersen, 2004). L'inoculation de *C. abortus* par voie sous cutanée chez les brebis avant le 25^{ème} jour de gestation provoque une placentite et des avortements dans les trois dernières semaines de gestation (Arquié, 2006). Après l'infection initiale, *C. abortus* se retrouve d'abord au niveau des macrophages et des cellules épithéliales des tonsilles palatines ou amygdales. Elle gagne par la suite la circulation sanguine et lymphatique pour se diffuser aux organes somatiques avant une nouvelle phase de chlamydémie (Jones et Anderson, 1988).

Dans l'étude expérimentale d'Amin et Wilsmore (1995), la chlamydémie a été observée 2 à 7 jours après l'inoculation expérimentale de *C. abortus* par voie orale et sous cutanée. Les *Chlamydiae* ont été d'abord retrouvées dans les amygdales, caillotte, jéjunum et nodules lymphoïdes mandibulaires (27 à 48 heures après l'inoculation) puis dans les poumons, rate, foie, reins et les autres tissus lymphoïdes (72 heures après l'inoculation). Ces auteurs suggérèrent que l'inoculât a infecté d'abord les tissus lymphoïdes du pharynx et la muqueuse du tractus gastro-intestinal des brebis. Après une phase initiale de multiplication à ce niveau et suite à la phase de chlamydémie déjà décrite, des tissus comme les poumons, le foie, les reins et d'autres tissus lymphoïdes sont infectés à leur tour (Amin et Wilsmore, 1995).

Un des éléments clés de la pathogénie de l'avortement à *C. abortus* est la placentite sévère accompagnant l'infection (Buxton *et al.*, 2002). Buxton *et al.* (1990) rapportent que les brebis sont susceptibles à l'infection dès le début de la gestation et que l'infection du fœtus et du placenta se produit à partir du 60^{ème} jour de gestation. Quoiqu'il est possible de détecter *C. abortus* plus tôt, les lésions placentaires et fœtales sont faibles voire absentes avant le 90^{ème} jour de gestation (Amin et Wilsmore, 1995). Ceci suggère que chez les brebis infectées durant la saison de reproduction précédente, les bactéries sont restées sous une forme dormante dans certains tissus jusqu'au milieu de la gestation quand l'invasion du placenta s'est produite (Amin et Wilsmore, 1995).

L'infection du placenta débute vers le 85^{ème} au 90^{ème} jour de gestation au niveau des cellules épithélio-choriales du hile des placentomes. Les lésions inflammatoires sont maximales à 120 jours de gestation (Buxton et Henderson, 1999 ; Entrican *et al.*, 2001). La caractéristique pathologique principale de l'infection à *C. abortus* est la nécrose de l'épithélium endométrial et du trophoblaste fœtal liée à des changements physiologiques qui se produisent dans le placenta vers le 60^{ème} jour de gestation (Sammin *et al.*, 2008). En effet, c'est à ce moment de la gestation qu'il y a invasion du stroma caronculaire par les villosités choriales, entraînant la formation d'hématomes qui sont le point de départ de la colonisation du placenta par *C. abortus* (Entrican *et al.*, 2001 ; Sammin *et al.*, 2008 ; Maley *et al.*, 2009 ; Rocchi *et al.*, 2009). *C. abortus* colonisent les cellules du trophoblaste. Il y a alors destruction des cellules épithélio-choriales fœtales. Un œdème et des lésions de nécrose sont notés. Ensuite, une infiltration par les neutrophiles, macrophages, lymphocytes et plasmocytes se développent dans les tissus avoisinants. Cette infiltration provoque au niveau du hile des placentomes des vascularites et des thromboses des vaisseaux sanguins allanto-choriaux (Navarro *et al.*, 2004) permettant la

colonisation des organes internes du fœtus par *C. abortus* avec formation de foyers d'inflammation et de nécrose dans le foie, le poumon et les nœuds lymphatiques (Amin et Wilshire, 1995). D'autre part, l'inflammation entraîne une diminution des échanges materno-fœtaux ce qui provoque des retards de croissance du fœtus voir sa mort. Des lésions de nécrose et d'inflammation sont aussi observées dans l'endomètre avec présence d'inclusions de *C. abortus* (Sammin *et al.*, 2008). On observe ainsi des avortements quand les brebis sont infectées avant le 110^{ème} jour de gestation (Sammin *et al.*, 2008 ; Maley *et al.*, 2009 ; Rocchi *et al.*, 2009).

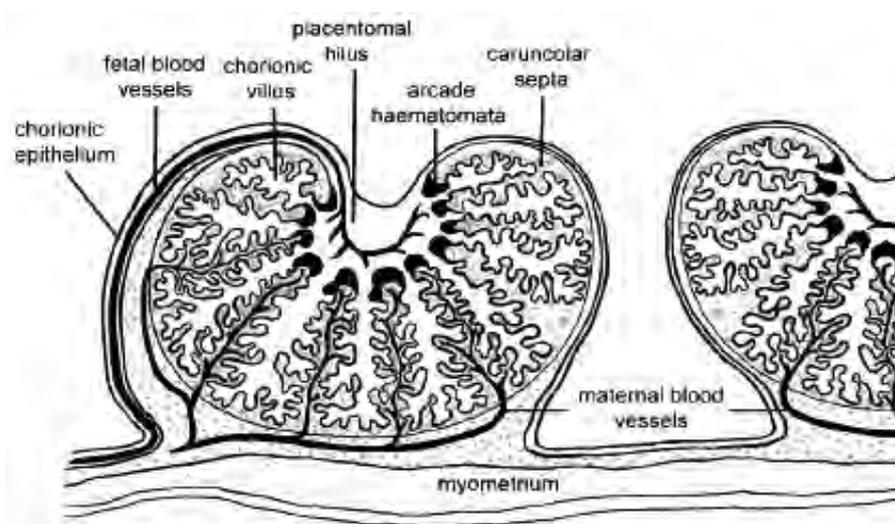


Figure 3 : Représentation schématique d'un placentome ovin (Rocchi *et al.*, 2009)

La durée de gestation chez la brebis est d'environ 143 jours. Le placenta est de type syndesmo-chorial, cotylédonnaire et indécidue (Bacha W. et Bacha L., 2012). Les brebis infectées par *C. abortus* n'expriment pas de signes cliniques apparents de la chlamydie abortive en dehors de la gestation (Livingstone *et al.*, 2009), en début et milieu de la gestation et avortent dans les deux ou trois dernières semaines de gestation (Longbottom et Coulter, 2003 ; Rocchi *et al.*, 2009). Les facteurs de réactivation et de réplication de *C. abortus* demeurent actuellement inconnus (Jones, 1995 ; Entrican *et al.*, 1998 ; Rocchi *et al.*, 2009). La gestation induit une immunosuppression chez le daim, chez la femme, chez la chienne et chez la souris gravide et plusieurs catégories de lymphocytes diminuent (Entrican *et al.*, 2001). Certains changements hormonaux tout au long de la gestation seraient à l'origine de la stimulation ou l'inhibition directe de la croissance des bactéries.

Le fait que les brebis infectées permanentes excrètent *C. abortus* sous forme élémentaire par leur tractus génital seulement pendant l'œstrus, suggère une influence certaine des hormones dans la multiplication *in vivo* de *C. abortus* (Papp *et al.*, 1994 ; Papp *et al.*, 1998 ; Arquí, 2006).

Toutes les brebis infectées lors d'une saison de mise bas donnée ne vont pas systématiquement développer de signes cliniques (Maley *et al.*, 2009). La diversité des signes cliniques observés doit être liée à la virulence de la souche de *Chlamydia*, à la dose infectante, à la variabilité individuelle et au stade physiologique de l'hôte (Buxton *et al.*, 1990 ; Papp *et al.*, 1993 ; Rodolakis *et al.*, 1998 ; Rocchi *et al.*, 2009). Certains auteurs suggèrent que la mise bas prématurée ou à terme d'agneaux chétifs et normaux est due à la perturbation des sécrétions placentaires d'hormones stéroïdes et de prostaglandines causée par la placentite (Aitken, 2000 ; Entrican *et al.*, 2001 ; Andersen, 2004 ; Rocchi *et al.*, 2009). Selon Entrican (2002), l'avortement est provoqué par plusieurs facteurs y compris la thrombose vasculaire induite par les cytokines, la rupture incontrôlée de l'épithélium chorionique, la perte de la fonction endocrinienne du placenta et l'interruption de la régulation hormonale de la gestation. La progestérone, hormone de maintien de la gestation et produite par les cellules épithéliales chorioniques en fin de gestation interagit avec l'œstradiol et la prostaglandine pour le déclenchement de l'agnelage. Quand la concentration de ces trois hormones est altérée par l'infection placentaire par *C. abortus*, ceci déclenche l'expulsion fœtale prématurée ou l'avortement.

Les bactéries du genre *Chlamydia* ont la capacité d'engendrer des infections persistantes et inapparentes chez un large éventail d'hôtes (Entrican *et al.*, 1998 ; Papp *et al.*, 1994). *C. abortus* peut subsister sous forme d'infection inapparente dans les tissus lymphoïdes d'un animal infecté, sous une forme immature ou peu voire non-infectieuse suite à la mise en place d'un équilibre du type « hôte-parasite » (Storz, 1971 ; Entrican *et al.*, 2001). Les mécanismes aboutissant à la mise en place d'une infection persistante font appel à la production de cytokines, en particulier les INF- γ , et à l'activation de réactions biochimiques intracellulaires (activation de l'indoleamine-2,3-dioxygénase et carence en tryptophane) qui limitent la multiplication des *Chlamydia* (Entrican, 2001 ; Caro *et al.*, 2009 ; Rocchi *et al.*, 2009). Le maintien d'une infection persistante à *C. abortus* pendant six mois dans des cultures cellulaires n'a pas diminuer sa virulence pour les brebis gestantes (Papp *et al.*, 1994). L'INF γ provenant des lymphocytes T activées limite la croissance des *Chlamydia* dans les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales. Les infections par *Chlamydia* induisent la production d'INF γ .

En outre, une faible concentration de l'INF γ *in vitro* induit une infection persistante (Entrican et al., 1998 ; Papp et al., 1994). La non production d'INF γ chez la souris permet la réplication *in vivo* de *C. abortus* (Entrican et al., 1998 ; Papp et al., 1994). L'avortement dû à *C. abortus* est suivi d'une immunité suffisante pour prévenir une nouvelle « chlamydémie » et une colonisation du placenta (Rodolakis, 2006).



Figure 4 : Fœtus et placenta provenant d'une brebis infectée expérimentalement par *C. abortus* à 70 jours de la gestation (Entrican et al., 2010)

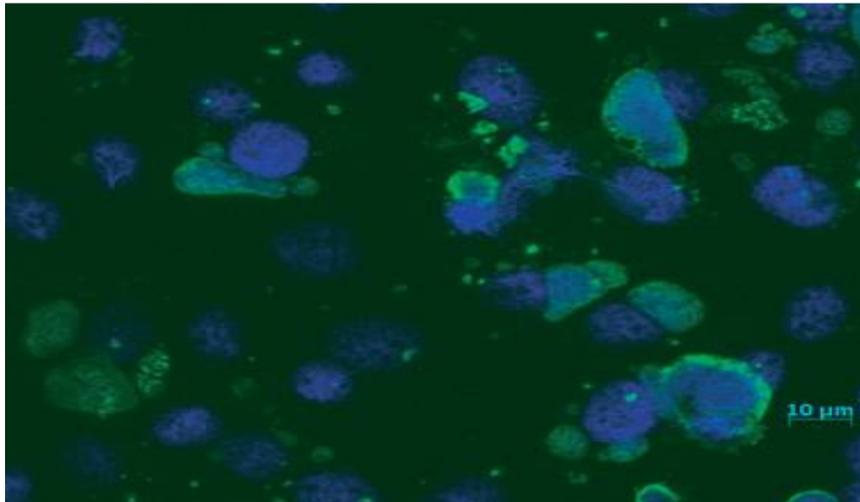


Figure 5 : Inclusions de *Chlamydiae* dans les cellules du trophoblaste ovin AH-1 infectées par *C. abortus* pendant 72 heures, fixées avec de l'acétone (Entrican et al., 2010)

Les inclusions sont marquées avec un anticorps monoclonal anti-LPS (13/5) et visualisées avec le FITC-anti-IgG de souris (en vert). Les noyaux de cellules sont colorés avec du DAPI (en bleu).

9. Epidémiologie synthétique

De part leurs conséquences en terme de morbidité et de mortalité, les maladies infectieuses notamment la chlamydie abortive ovine ont de tous temps suscité des politiques de santé publique et préoccupé les autorités sanitaires à travers le monde. Cette affection bactérienne est reconnue cause majeure de pertes reproductives chez les petits ruminants dans de nombreux pays (Stuen et Longbottom, 2011). Alors qu'elle a été reportée pour la première fois en Écosse en 1936, l'agent étiologique n'a pu être identifié qu'en 1950 (Stamp *et al.*, 1950). L'avortement enzootique ovin a été reconnu par la suite comme la cause la plus importante d'avortement chez les ovins.

C. abortus est une bactérie à répartition mondiale, à l'exception de l'Australie et la Nouvelle-Zélande (Aitken et Longbottom, 2007). Elle représente la première cause d'avortement chez les ovins et caprins en France et dans les pays du pourtour méditerranéen. En France, elle sévit de façon endémique et représente la première cause d'avortement ovin dans le sud ouest, le massif central et la région Provence côte d'Azur (Souriau *et al.*, 1996 ; Aitken, 2000 ; Rodolakis, 2006 ; Aitken et Longbottom, 2007 ; Smith et Sherman, 2009).

Chapitre II

Aspects cliniques et lésionnels de l'avortement enzootique des brebis

1. Signes cliniques

Les infections à *Chlamydia* sont responsables de plusieurs conditions pathologiques : pneumonie, avortement, infection urogénitale, mammite, polyarthrite-polysérosite, diarrhée, encéphalomyélite, hépatite et conjonctivite (Shewen, 1980).

Chez les petits ruminants, l'avortement en fin de gestation est le principal signe clinique de la chlamydiose abortive ovine. Quand l'infection se produit à mi-gestation, le risque d'avortement s'élève à 80 % (Aitken, 2000). En cas de primo-infection d'un troupeau, près de 30% des brebis gestantes peuvent avorter la première année quand la maladie s'installe dans l'élevage (Aitken, 2000). En général, quand l'éleveur ne contrôle pas la maladie après cet épisode de chlamydiose abortive, on note des taux d'avortements élevés estimés jusqu'à 20 % pendant deux années consécutives. Ensuite, la situation se stabilise autour de 10 % jusqu'au jour où l'on enregistre une nouvelle flambée d'avortements chez les primipares (Aitken, 2000 ; Nietfeld, 2001 ; Milne *et al.*, 2009).

Souvent, la brebis ne présente aucun signe apparent de la maladie sauf un écoulement vulvaire rouge brunâtre 1 à 2 jours avant l'avortement et des déjections utérines marron rouge qui peuvent persister 2 à 3 semaines après l'avortement ou l'agnelage puis la brebis se remet bien (Aitken, 2000 ; Nietfeld, 2001 ; Andersen, 2004 ; Aitken et Longbottom, 2007 ; Livingstone *et al.*, 2009).

Si l'infection a lieu en début de gestation, une mortalité embryonnaire se produit. Celle-ci passe inaperçue et la brebis revient alors en chaleur tardivement (Aitken, 2000). Par contre, si l'infection se produit après 110 jours de gestation, la brebis mettra bas des agneaux mort-nés ou des agneaux chétifs qui meurent dans les 24 heures suivant leur naissance ou survivent avec des complications de pneumonie, d'arthrite ou de conjonctivite (Aitken, 2000). Les agnelles nées de mères infectées seront porteuses d'infection, mettront bas normalement l'année de l'infection et avorteront dans les années qui suivent (Nietfeld, 2001 ; Milne *et al.*, 2009). Il y a parfois de l'hypogalactie si l'avortement survient suffisamment tôt. Les métrites et rétentions placentaires sont le plus souvent notées chez les chèvres que chez les brebis (Aitken, 2000 ; Nietfeld, 2001).

Certaines portées sont composées à la fois d'agneaux chétifs et en bon état général (Papp et Shewen, 1996a ; Rodolakis *et al.*, 1998 ; Aitken, 2000 ; Entrican *et al.*, 2001 ; Nietfeld, 2001 ; Rekiki, 2004 ; Andersen, 2004). Il est rare qu'une brebis avorte deux fois de chlamydiaose car l'immunité acquise lors d'une primo-infection la protégerait (Kerr *et al.*, 2005 ; Sammin *et al.*, 2006 ; Livingstone *et al.*, 2009 ; Milne *et al.*, 2009 ; Rocchi *et al.*, 2009). Par contre, une exposition successive de brebis naïves à un environnement contaminé n'induit pas d'immunité suffisamment forte et durable pour empêcher l'expression clinique de la maladie et l'excrétion de *C. abortus* lors de leurs portées suivantes (Rodolakis et Souriau, 1980).

L'évolution de la maladie est généralement favorable. Parfois une rétention placentaire ou non expulsion du fœtus avec momification sont suivis de surinfections bactériennes qui peuvent provoquer la mort de la brebis (Brugère-Picoux, 2011).

2. Lésions

En général, les fœtus expulsés ont un aspect normal. Cependant, les agneaux avortés peuvent être recouverts d'un enduit crémeux jaunâtre lié à la nécrose des enveloppes fœtales. Ils peuvent également présenter de l'ascite, de l'œdème sous-cutané ou encore des pétéchies sur les muqueuses buccales, la langue, le tissu conjonctif sous-cutané et les organes internes, la plèvre et le péritoine (Aitken, 2000 ; Nietfeld, 2001 ; Arquié, 2006).

Par ailleurs, les lésions les plus sévères et constantes de la chlamydiaose abortive résident dans le placenta. Ce dernier est inflammé, épaissit et présente une nécrose cotylédonaire multifocale (foyers de nécrose de 1 à 3 mm de couleur jaune marron) (Miller *et al.*, 1990). Les cotylédons sont décolorés et nécrosés. L'espace intercotylédonaire est également épaissi, œdémateux, recouverte d'un exsudat floconneux brun chocolat et présente parfois des hémorragies (Miller *et al.*, 1990 ; Aitken, 2000 ; Nietfeld, 2001 ; Sammin *et al.*, 2006 ; Rocchi *et al.*, 2008 ; Livingstone *et al.*, 2009).



Figure 6 : Avorton de brebis (photo : Rook) (Brugère-Picoux, 2011)

Cet œdème sous-cutané avec un exsudat teinté de sang est observé sur de nombreux avortons morts in utero et non expulsés immédiatement. Cet aspect « cuit » de l'avorton (lié à cette rétention in utero) ne permet pas un diagnostic différentiel entre les avortements.

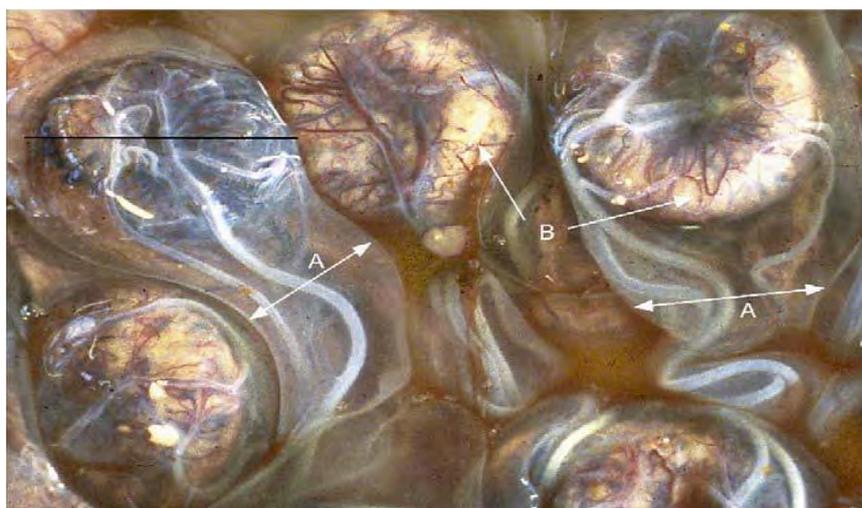


Figure 7 : Placenta d'une brebis 28 jours après une infection expérimentale par *C. abortus* (Sammin *et al.*, 2006)

A : œdème de la chorioallantoïde B : nécrose périplacentomale.
La ligne noire indique le plan de coupe du placentome illustré dans la Figure 8.

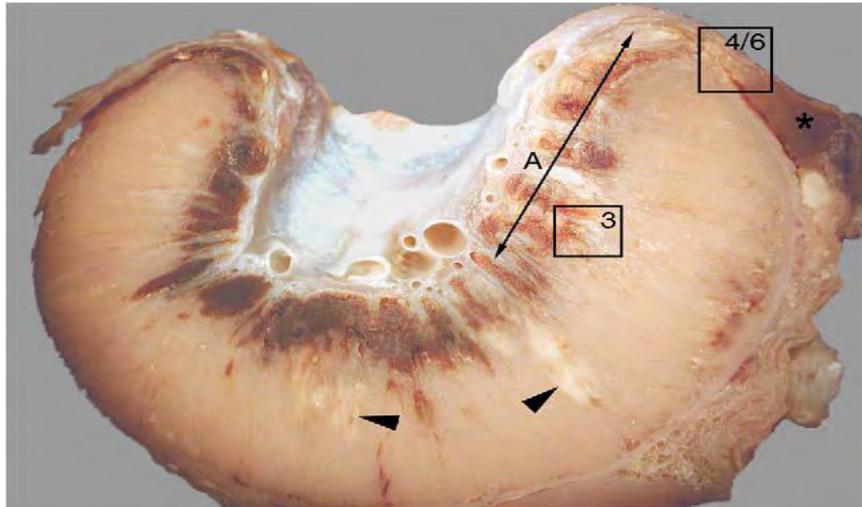


Figure 8 : Placentome d'une brebis 28 jours après une infection expérimentale à *C. abortus*, fixé au formol, surface d'une coupe transversale (Sammin *et al.*, 2006)

(A) : lésions étendues focalisées dans le hile du placentome. Flèches : foyers nécrotiques pâles de localisation profonde au sein du placentome. * : Agrégation périplacentomale de débris cellulaires. Les zones 3, 4 et 6 indiquent les emplacements anatomiques des figures 11 et 12.

A l'autopsie, l'avorton présente parfois une quantité anormale de liquide dans la cavité abdominale en plus d'une nécrose multifocale sur le foie et une hypertrophie des nœuds lymphatiques, mais dans la plupart des cas aucune lésion macroscopique n'est notée (Buxton *et al.*, 1990 ; Sammin *et al.*, 2005).

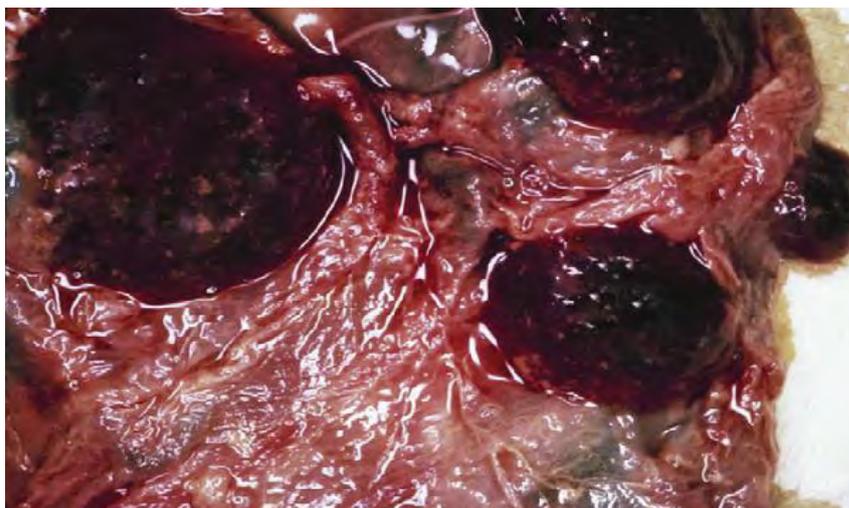
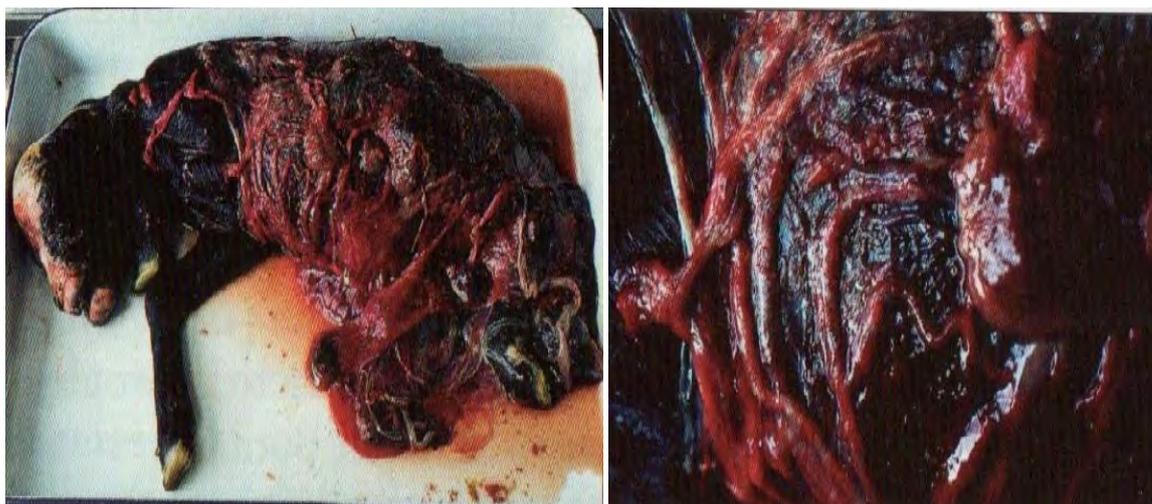


Figure 9 : Placentite à *C. abortus* chez une chèvre (Pugh et Baird, 2012)

(Photo de Dr. P Blanchard, California Animal Health and Food Safety Laboratory)
Lésions de nécrose sur les cotylédons, avec épaissement et opacité du tissu intercotylédonaire. Le placenta est recouvert d'un exsudat rouge marron



Figures 10 : Chlamydophilose ovine (placentite) (Brugère-Picoux, 2011)

(Photos Rodolakis, A.) Cette placentite est caractérisée par une nécrose touchant les cotylédons (au début, atteinte de la périphérie puis extension à tout le cotylédon) avec un épaissement du tissu intercotylédonaire. L'absence de lésions sur l'avorton permet de suspecter une chlamydophilose.

Les organes internes du fœtus sont généralement bien préservés. Cependant, le foie peut être congestionné, légèrement hypertrophié et/ou présenter de nombreuses zones nécrosées blanchâtres (Robert et Moeller, 2012).

De nombreuses zones de nécrose multifocale avec infiltration des neutrophiles et des cellules mononuclées sont aussi observées au niveau de la rate et des nodules lymphoïdes (Robert et Moeller, 2012). Une méningo-encéphalite non suppurative légère avec vascularite peut être retrouvée au niveau du cerveau (Robert et Moeller, 2012). Dans les poumons, une infiltration interstitielle légère des cellules inflammatoires mononuclées peut causer un épaissement des septa alvéolaires et de l'interstitium pulmonaire (Robert et Moeller, 2012).

Les lésions microscopiques sur le placenta sont représentées par les lésions inflammatoires, une vascularite placentaire avec nécrose et infiltration par des polynucléaires neutrophiles et des monocytes. Les lésions microscopiques sur le fœtus sont rares voire absentes. Cependant, des lésions locales de coagulation dans le foie et la rate, de nécrose splénique ou hépatique, une pneumonie interstitielle et encéphalite peuvent être observées (Miller *et al.*, 1990 ; Rodolakis, 1998 ; Pugh et Baird, 2012).

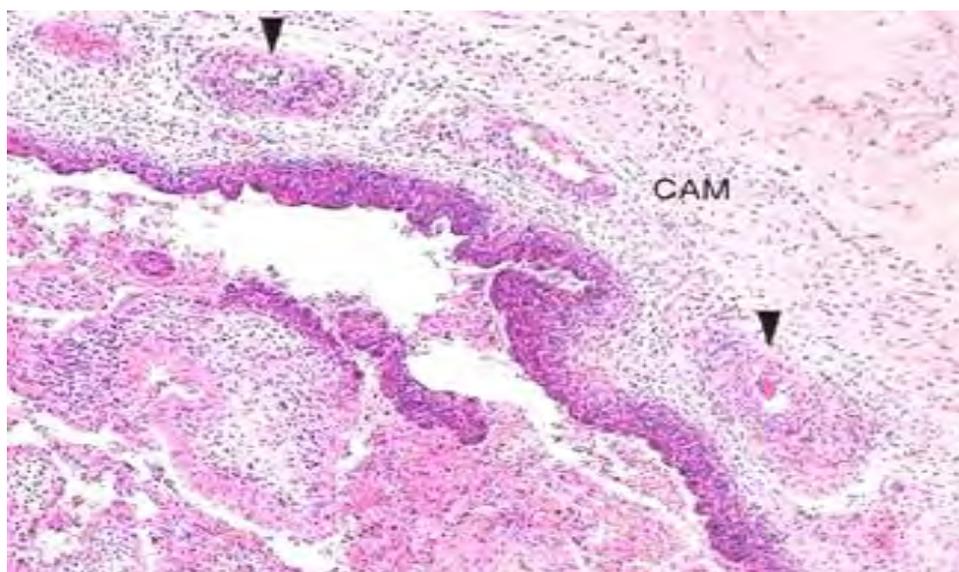


Figure 11 : Placentome d'une brebis 28 jours après l'infection expérimentale par *C. abortus* (Sammin *et al.*, 2006)

Inflammation sévère dans la membrane chorioallontoïdienne (CAM) avec artérite (flèches), HE x40.

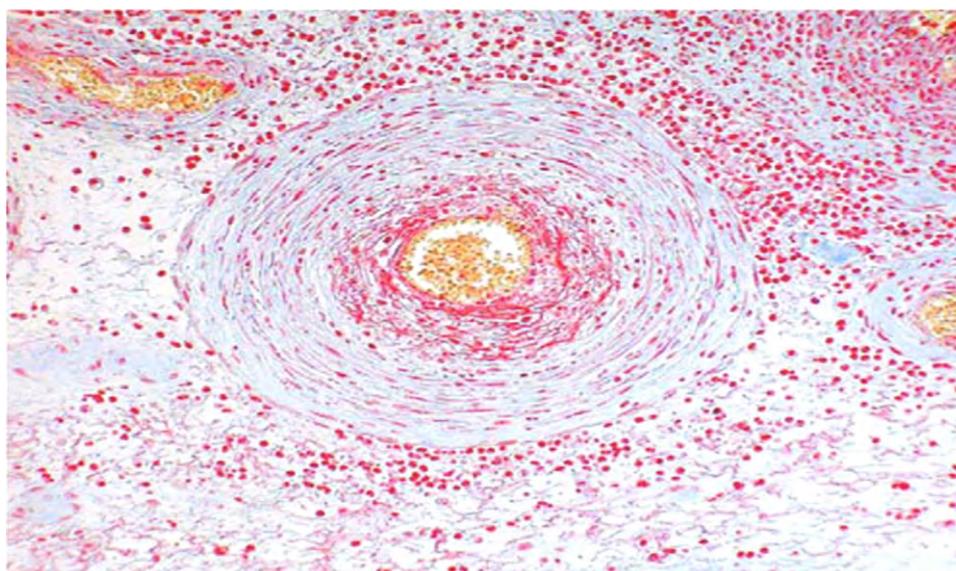


Figure 12 : Membrane chorioallontoïdienne du placenta d'une brebis 28 jours après l'infection expérimentale par *C. abortus* (Sammin *et al.*, 2006)

Dégénérescence fibrinoïde d'une artère, MSB x200.

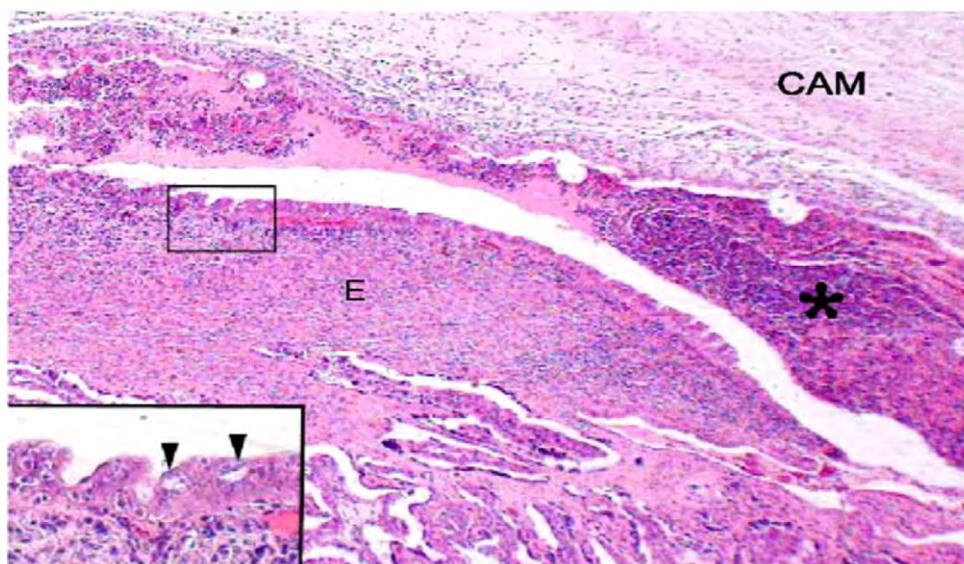


Figure 13 : Limbe placentomal 28 jours après infection expérimentale d'une brebis par *C. abortus* (Sammin *et al.*, 2006).

Accumulation d'exsudat (*) entre la CAM et l'endomètre. (E) : endométrite focalisée (zone encadrée). HE x40. Encadrement : vue agrandie (x200), présence d'inclusions à *C. abortus* (flèches) au sein de l'épithélium endométrial avec infiltration lymphocytaire.

Dans l'étude de Miller *et al.* (1990), une infiltration des espaces alvéolaires par des histiocytes et quelques neutrophiles a été observée dans 3 sur 12 poumons examinés.

Il en ressort alors que la chlamydie abortive entraîne une baisse de prolificité et de fertilité des brebis, ce qui se solde par des pertes économiques relativement élevées pour les éleveurs. Le diagnostic de la maladie demeure donc impératif. Celui-ci doit être précoce pour permettre la mise en place de moyens de lutte efficace afin d'éviter sa diffusion, surtout aux agnelles de renouvellement.

Chapitre III

Outils de diagnostic de l'avortement enzootique des brebis

Les signes cliniques et les lésions macroscopiques du fœtus et du placenta ne permettent pas d'établir un diagnostic de certitude de l'avortement enzootique des brebis. Les éléments épidémiologiques et cliniques orientent seulement dans le diagnostic différentiel des étiologies de l'avortement (Rodolakis, 2006). Ainsi, le diagnostic de la chlamyphilose doit obligatoirement être un diagnostic de laboratoire. Celui-ci repose sur des méthodes directes basées sur l'isolement et l'identification de *C. abortus* ou la recherche de son acide nucléique dans les produits de l'avortement, placentas et/ou les écouvillonnages de sécrétions vaginales de brebis ayant récemment avorté. Par ailleurs, des méthodes indirectes sont basées sur la recherche d'une réponse humorale dans des prélèvements sanguins.

1. Diagnostic direct

La mise en évidence de l'agent pathogène dans le placenta ou les organes fœtaux est possible par culture cellulaire, immunohistochimie sur tissus fixés, immunofluorescence sur frottis, cryo coupes, coloration spéciale de frottis du placenta, isolement d'ADN, PCR classique ou par PCR en temps réel.

1.1. Bactérioscopie

La détection des corps élémentaires de *C. abortus* par bactérioscopie peut se faire à l'aide de calques de placenta (villosités choriales lésées) ou de tissus fœtaux. Des frottis d'écouvillons de la toison humide d'avortons ou encore de sécrétions vaginales provenant de femelles avortées ou donnant naissance à un mort-né, sont possibles dans les 24 heures suivant l'avortement (Aitken et Longbottom, 2004).

Les calques réalisés sur lames sont colorés au Gimenez, Giemsa, colorants modifiés de Ziehl-Neelsen, Machiavello ou par immunofluorescence (Radostits *et al.*, 1994 ; Souriau *et al.*, 1996 ; Rodolakis *et al.*, 1998 ; Rodolakis 2001 ; Aitken et Longbottom 2004). Ils sont visualisés à l'aide d'un microscope à forte résolution.

Un nombre important de corps élémentaires de forme coccoïde (300 nm) sont observés, isolés ou groupés en rouge sur fond bleu correspondant aux débris cellulaires. Avec un microscope à fond noir, les EBs apparaissent en vert pâle.

Les inclusions intracellulaires de *C. abortus* peuvent aussi être visualisées par coloration de Giemsa de coupes minces (4 µm) provenant des tissus cibles fixés dans des solutions telles que le liquide de Bouin ou de Carnoy (Aitken et Longbottom, 2004). Le microorganisme peut être mis en évidence dans le cytoplasme des cellules trophoblastiques, et parfois dans le cytoplasme des cellules inflammatoires (Szeredi et Bacsadi, 2002).

Bien que la bactérioscopie soit rapide et facile, son interprétation demande un personnel expérimenté afin d'éviter des erreurs liées à la confusion de *C. abortus* avec *Brucella* sp. et *Coxiella burnetii* (Aitken, 2000 ; Nietfeld, 2001).

1.2. Culture cellulaire

Etant donné que *C. abortus* ne se multiplie pas en dehors des cellules eucaryotes, son isolement sur culture cellulaire, sur œuf embryonné ou sur souris n'est pas réalisé pour le diagnostic de routine, car trop onéreux et nécessite trop de temps. En outre, la culture de cette bactérie nécessite un laboratoire protégé de niveau 3 disposant d'équipements pour la culture sur œufs embryonnés ou pour la culture cellulaire (Rekiki, 2004 ; Rodolakis, 2006 ; OIE, 2013). En plus, la technique requiert que les échantillons soient exempts de toute contamination. Ceci n'est pas toujours possible car les prélèvements sont souillés dans la majorité des cas. De plus, les chlamydies sont fragiles dans le milieu extérieur et meurent avant l'arrivée des spécimens au laboratoire. Par ailleurs, les échantillons de membranes fœtales, tissus fœtaux ou écouvillons vaginaux, doivent être mis en culture rapidement après avoir été maintenus dans un milieu de transport approprié. Le milieu le plus satisfaisant est le milieu « sucrose/phosphate/glutamate » ou milieu SPG (sucrose [74,6 g/litre], KH₂PO₄ [0,512 g/litre], K₂HPO₄ [1,237 g/litre], acide L-glutamique [0,721 g/litre]) supplémentés par 10 % de sérum fœtal bovin, des antibiotiques (la streptomycine et la gentamicine) et un fongistatique (Johnson *et al.*, 1983 ; OIE, 2008).

C. abortus peut être isolée à partir de nombreuses lignées cellulaires, mais les cellules McCoy, BGM (Buffalo green monkey) ou BHK (Baby hamster kidney) sont les plus utilisées (OIE, 2008).

Pour un diagnostic de confirmation, des cellules monocouches sont resuspendues en milieu de culture à raison de 2×10^5 cellules/ml. 2 ml de cette suspension cellulaire sont distribués dans des flasques de culture cellulaire dotés d'un bouchon de 16 mm. Les monocouches confluentes se forment après 24 heures d'incubation à 37°C. Le milieu de croissance est éliminé puis remplacé par 2 ml d'inoculum à tester (OIE, 2008). Les flacons sont centrifugés à 2500 g pendant 30 minutes afin de favoriser l'infection. Après une incubation de 2 à 3 jours, le tapis cellulaire est fixé au méthanol et coloré par la méthode de Giemsa ou de Gimenez. Après la fixation, les cellules infectées contiennent des inclusions intra cytoplasmiques basophiles (Giemsa) ou éosinophiles (Gimenez) (OIE, 2008).

1.3. Culture sur œufs embryonnés

Les échantillons à tester sont préparés à 10 % en milieu nutritif contenant de la streptomycine (200 µg/ml). Ensuite, 0,2 ml de cette suspension sont inoculés dans le sac vitellin d'embryons âgés de 6 à 8 jours et incubés à 37°C. Les embryons infectés meurent entre le 4^{ème} et 13^{ème} jour après inoculation. Les calques préparés à partir des membranes vitellines vascularisées révèlent la présence de nombreux corps élémentaires (OIE, 2008).

1.4. Technique des plages de lyse

L'isolement de *C. abortus* peut être aussi réalisé par la formation de plages de lyse sur un tapis de cellules L ou McCoy en milieu gélosé (Rodolakis et Chancerelle, 1977). Cette technique présente l'avantage d'être macroscopique et quantitative. Elle permet en outre la réalisation d'antibiogramme et le clonage des souches, indispensable pour leur caractérisation. Les plages sont visibles après 8 à 14 jours de culture, en fonction des souches et des conditions de culture ce qui limite l'utilisation de cette technique (Rodolakis, 1998).

1.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Le manque de sensibilité et de spécificité des méthodes de diagnostic indirect de la chlamydie abortive, incite les praticiens à faire appel aux avancées récentes en biologie moléculaire. L'amplification génomique est la technique de choix pour la détection de *C. abortus* en raison de sa sensibilité très élevée. La PCR apporte aussi un diagnostic plus rapide pour révéler la présence de *C. abortus*.

Seule la PCR permet d'identifier facilement les troupeaux et les animaux qui excrètent (Rodolakis, 2006).

Cette technique constitue le plus important apport au diagnostic de la chlamydie ces dernières années et plusieurs kits sont disponibles, utilisant une PCR classique ou une PCR en temps réel, simple ou multiplex (Rodolakis, 2006).

L'analyse du profil de restriction des fragments d'ADN amplifiés par PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) et l'utilisation d'amorces spécifiques permettent de distinguer les différentes espèces de *Chlamydia* (Denamur *et al.*, 1991 ; Meijer *et al.*, 1997 ; Rodolakis, 1998 ; Everett et Andersen, 1999 ; Everett, 2000 ; Rekiki, 2004 ; Corsaro et Greub, 2006).

La PCR en temps réel a été conçue pour permettre la détection rapide, sensible et spécifique de *C. abortus*, offrant ainsi un nouveau test de routine approprié (Pantchev *et al.*, 2009). L'amplification par PCR en temps réel de l'ADN de *C. abortus*, en utilisant des amorces spécifiques à la membrane externe de *C. abortus* a été réalisée sur des échantillons de placenta comme décrite par Livingstone *et al.* (2009). La PCR basé sur l'amplification des segments des gènes 16S et 23S d'ARN ribosomique présente une sensibilité et une spécificité élevée (Meijer *et al.*, 1997; Madico *et al.*, 2000).

Le choix d'une méthode adéquate pour l'extraction d'acide nucléique est également important dans l'optimisation des systèmes de PCR. Idéalement, le placenta doit être soumis pour le diagnostic par PCR (Innis et Gelfand, 1990).

En dehors de son coût, les principaux inconvénients de la PCR sont les risques de génération de résultats faussement négatifs du fait de la présence de substances inhibitrices de la PCR dans les échantillons ou faussement positifs par contamination croisée entre les échantillons (Rodolakis, 2006). Les faux négatifs, dus à des inhibiteurs peuvent être détectés grâce à un témoin interne et leur nombre peut être réduit par une extraction d'ADN (Rodolakis, 2006). Les faux positifs peuvent être évités par des précautions de manipulations rigoureuses.

La mise en évidence d'antigènes de *C. abortus* par des techniques d'immunohistochimie, immunofluorescence (IF), Fluorescence Antibody Test (FAT), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), est plus spécifique que la bactérioscopie, plus sensible et plus rapide que l'isolement bactérien, mais leur coût reste trop élevé pour être utilisé en routine dans le diagnostic de la chlamydie (Miller *et al.*, 1990 ; Rodolakis *et al.*, 1998 ; Andersen, 2004 ; Rekiki, 2004).

2. Diagnostic indirect ou diagnostic sérologique

La sérologie s'avère la méthode la plus pratique pour le diagnostic de l'infection et non pas de l'avortement. Une recherche sérologique ne permet qu'un diagnostic de suspicion, car les anticorps peuvent persister pendant plusieurs années chez la brebis.

Cependant, à cause de la présence de *C. pecorum*, que plusieurs animaux possèdent dans leur tractus digestif, et du fait du manque de spécificité et de sensibilité de certaines de ces techniques, un bruit de fond sérologique est souvent présent et rend difficile la différenciation entre les animaux infectés par *C. abortus* de ceux infectés par *C. pecorum* (Souriau *et al.*, 1996 ; Rodolakis *et al.*, 1998). D'autre part, le diagnostic sérologique de la chlamyphilose n'est qu'un diagnostic de présomption : il ne permet pas de différencier un avortement dû à *C. abortus* d'un portage latent de *C. abortus* (Aitken, 2000 ; Rekiki, 2004 ; Gerber *et al.*, 2007 ; Milne *et al.*, 2009).

Puisque les taux d'anticorps produits suite à un avortement restent très élevés jusqu'à la mise bas suivante, on ne peut pas établir un diagnostic d'avortement précis en cas d'avortements successifs (Rodolakis et Souriau, 1980 ; Wilsmore *et al.*, 1990 ; Livingstone *et al.*, 2008).

La sérologie ne permet pas aussi de discerner les animaux vaccinés de ceux naturellement infectés (Borel *et al.*, 2005 ; Gerber *et al.*, 2007). En somme, les méthodes de diagnostic indirect ne sont optimisées que pour un diagnostic de troupeau dans un troupeau non vacciné, sur 10 % des animaux avec un minimum de 10 animaux testés (Rodolakis, 2006). Cependant, la recherche d'antigènes spécifiques de *C. abortus*, utilisables pour le diagnostic sérologique a amélioré considérablement ce diagnostic (Souriau *et al.*, 1994).

Il existe plusieurs techniques de diagnostic sérologique de l'avortement enzootique des brebis dont l'immunofluorescence, la fixation du complément et l'ELISA.

2.1. Immunofluorescence

La technique d'immunofluorescence présente l'avantage d'être beaucoup plus sensible et plus spécifique que la culture cellulaire, surtout depuis la généralisation de l'utilisation des anticorps monoclonaux. Cependant, son utilisation en médecine vétérinaire pour la mise en évidence des *Chlamydiae* demeure rare.

Lors d'avortements bovins, Houwers et De Jong (1986) ont conclu que la recherche des *Chlamydiae* par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux directement dans des cryo coupes de produits d'avortements était plus sensible que l'isolement sur culture cellulaire. Par contre, cette technique est largement utilisée en médecine humaine (Tam *et al.*, 1984 ; Uyeda *et al.*, 1984 ; Teare *et al.*, 1985 ; Lipkin *et al.*, 1986 ; Tijam *et al.*, 1985).

2.2. Test de fixation du complément (TFC)

La technique de fixation du complément manque de sensibilité et de spécificité en raison des réactions croisées avec *C. pecorum* qui est retrouvée normalement dans l'intestin de la plupart des petits ruminants (Rodolakis, 2001), mais aussi avec quelques bactéries à Gram négatif comme les souches du genre *Acinetobacter* qui peuvent générer des résultats faussement positifs (Nurminen *et al.*, 1985). Des titres inférieurs au 1/32 pour un seul individu sont considérés comme non spécifiques de *C. abortus*, bien qu'ils puissent être dus à un faible taux d'infection à *C. abortus*. Les résultats douteux sont généralement testés à nouveau par analyse Western blot, en utilisant des corps élémentaires purifiés (Buzoni-gatel et Rodolakis, 1983 ; Rodolakis *et al.*, 1998 ; Berri *et al.*, 2004).

L'usage du TFC pose problème en particulier dans le cas de sérums infectés par les deux souches *C. abortus* et *C. pecorum*. C'est pourquoi il est recommandé de réaliser ce test 3 à 6 semaines après l'avortement ou la délivrance d'agneaux mort-nés c'est-à-dire lorsque la réponse humorale en anticorps atteint son niveau maximal (Rodolakis, 2001). Dès lors, des sérums appariés collectés au moment de l'avortement et au plus tard 3 semaines après peuvent révéler une élévation du titre anticorps par le TFC. Selon certains auteurs, le TFC ne doit être utilisé pour le diagnostic chez des jeunes animaux ou pour détecter l'infection chez l'Homme en raison de sa faible sensibilité et spécificité (Dawson, 1988; Rodolakis *et al.*, 1998 ; Rodolakis, 2001). Les jeunes animaux ne sont pas susceptibles de produire des titres en anticorps, suffisamment élevés pour être détectés par ce test (Buendia *et al.*, 2001).

2.3. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Il existe un certain nombre de tests ELISA basés sur la réactivité aux trois principaux antigènes immunodominants sur la surface des EBs des *Chlamydia* (Anderson *et al.*, 1995) : le LPS (Griffiths *et al.*, 1996), la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) (Kaltenboeck *et al.*, 1997 ; Salti-Montesanto *et al.*, 1997 ; Hoelzle *et al.*, 2004) et les protéines polymorphes de la membrane externe (POMP) (Buendia *et al.*, 2001).

Ces tests utilisent des préparations d'antigènes soit en utilisant les EBs en entier, des extraits solubilisés ou des peptides et des préparations d'antigènes recombinants (Anderson *et al.*, 1995 ; Griffiths *et al.*, 1996 ; Kaltenboeck *et al.*, 1997 ; Salti-Montesanto *et al.*, 1997 ; Hoelzle *et al.*, 2004). Un manque de spécificité se retrouve avec la plupart des tests ELISA. Cependant l'utilisation d'antigènes recombinants propres à *C. abortus* continuent d'évoluer considérablement. Un kit Elisa-r (Pourquier, Montpellier, France) utilise un antigène recombinant spécifique de *C. abortus* (Rekiki, 2004 ; Vretou *et al.*, 2007 ; Wilson *et al.*, 2009). Le test ELISA rOMP90-3 est à base de protéines recombinantes de fragments du POMP90 de *C. abortus* (Longbottom *et al.*, 2002), il est non seulement plus précis que le TFC, mais est également plus sensible et spécifique que l'ELISA Pourquier. Le dépistage précoce des animaux infectés est devenu possible car la réponse en anticorps peut être détectée 8 jours après l'infection (Rodolakis, 2006).

Chapitre IV

Diagnostic différentiel des avortements infectieux chez la brebis : Accent mis sur la coxiellose, la salmonellose, la néosporose et la brucellose

Connaitre l'étiologie des avortements est indispensable afin de mettre en place le traitement et la stratégie préventive adaptée. Cependant, les signes cliniques et les indicateurs épidémiologiques sont généralement insuffisants pour porter un diagnostic de certitude. Le vétérinaire peut diagnostiquer 25 à 50 % des avortements sur la base des commémoratifs et des lésions observées. Cependant, les examens de laboratoire permettent d'identifier la cause dans 60 % des cas (Brugère-Picoux, 2011).

Le plus souvent, un avortement est d'origine infectieuse. On distingue les avortements dus à une atteinte placentaire (*Chlamydia*, *Toxoplasma*, mycose, etc.) des avortements liés à une septicémie (*Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*) ou à une atteinte du fœtus (*Toxoplasma*, *Campylobacter*, *Listeria*, pestivirus, mycose).

L'avortement est associé à des déformations des agneaux lors de la pestivirus, la fièvre de la Vallée du Rift, la maladie d'Akabane, la fièvre catarrhale ovine et la maladie de Wesselsbron, etc. Par contre, dans les cas d'avortement par la brucellose, la fièvre de la vallée du Rift, la campylobactériose, la fièvre Q, la listériose, la leptospirose, l'agalaxie contagieuse, la salmonellose (*Salmonella abortus ovis*), la fièvre à tiques (ehrlichiose) ou encore par la colibacillose, les agneaux sont bien préservés (Brugère-Picoux, 2011).

Anaplasma phagocytophilum (*Ehrlichia* ou *Cytoecetes phagocytophila*), transmise par les tiques, provoque une hyperthermie de 42° C pendant 7 à 10 jours pouvant provoquer un avortement. La maladie d'Akabane, rencontrée au Japon, en Israël, en Turquie et en Australie, est due à un bunyavirus (groupe Simbu), dont l'action tératogène se traduit par un syndrome d'hydranencéphalie-arthrogrypose avec avortement et mortinatalité.

La maladie de Wesselsbron est causée par un virus de la famille des *Togaviridae*. Transmise par les moustiques et rencontrée sur le continent africain, elle ressemble à la fièvre de la vallée du Rift. Il s'agit d'une zoonose non contagieuse (syndrome grippal chez l'homme) (Brugère-Picoux, 2011).

D'autres bactéries, comme *Mannheimia haemolytica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Francisella tularensis*, *Bacillus* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Histophilus ovis*, etc., peuvent parfois causer un avortement (Brugère-Picoux, 2011).

Les avortements peuvent aussi être d'origine parasitaire. Il s'agit principalement de la toxoplasmose causée par *Toxoplasma gondii*. Ce protozoaire peut être responsable de 5 à 50 % des avortements dans un troupeau de brebis (Brugère-Picoux, 2011).

1. La brucellose (*Brucella melitensis*)

La brucellose ovine (ou mélitococcie) est une maladie infectieuse, contagieuse, due principalement à *Brucella melitensis* qui se traduit cliniquement par des avortements chez la brebis et par une orchite ou une épididymite chez le bélier. Cette infection occasionne de graves pertes économiques et représente un risque zoonotique (Benkirane, 2006 ; Shareef, 2006). La contamination de l'environnement par les matières virulentes (fœtus, membranes fœtales et sécrétions vaginales) assure la propagation de l'infection. La transmission s'effectue principalement par la voie respiratoire, digestive mais aussi par la voie oculaire et transcutanée. Chez les brebis gestantes, la bactérie atteint l'utérus et se multiplie dans le placenta et les tissus fœtaux. Chez les femelles non gravides, *Brucella* peut provoquer une infection chronique cliniquement inapparente et sans excrétion vaginale. L'évolution de l'infection est cyclique dans les régions endémiques. La primo-infection du troupeau touche 50 à 90 % des brebis gravides, alors qu'une année plus tard on observe une rémission avec 10 % d'avortements. La troisième année, l'agnelage est pratiquement normal, sauf pour les femelles nouvellement introduites dans le troupeau (Brugère-Picoux, 2011).

L'avortement survient rapidement après la contamination, le plus souvent au cours du troisième ou quatrième mois de gestation mais il peut se produire à tous les stades de la gestation.

La brucellose sévit sous une forme enzootique. Si certaines femelles infectées mettent bas à terme, la mortalité néonatale sera élevée. Les brebis atteintes peuvent rester porteuses de *Brucella melitensis*, d'où un risque de contamination pour l'Homme. Chez les béliers, l'infection est généralement inapparente quoi qu'il soit possible de noter des cas d'orchite, d'épididymite ou une baisse de fertilité.

L'examen nécropsique révèle un œdème utérin, une rétention placentaire partielle et un placenta œdémateux avec des zones focalisées de nécrose. L'avorton présente souvent un œdème généralisé.

Le diagnostic de laboratoire repose sur l'examen bactériologique ou la mise en évidence de l'antigène dans le sang, le lait, le placenta ou le fœtus. Par ailleurs, les anticorps dirigés contre *Brucella melitensis* peuvent être révélés par ELISA, fixation du complément ou par le test d'agglutination. D'autres tests sont disponibles tels que la PCR et le diagnostic allergique.

2. La salmonellose abortive (*Salmonella abortus ovis*)

La contamination des animaux d'un élevage se produit généralement après l'introduction de reproducteurs, une transhumance ou suite à l'ingestion d'aliments ou d'eau souillés par des produits d'avortements ovins, ou encore par excrétion fécale des salmonelles par des porteurs cliniquement sains, notamment les oiseaux.

Bien que les modalités de transmission de la salmonellose abortive soient mal connues, la diffusion du germe est importante autour des saisons d'agnelage, surtout que la bactérie est résistante dans l'environnement de l'élevage. Il semble aussi que l'apparition de la maladie est favorisée par l'influence de certains facteurs tels que le stress (Brugère-Picoux, 2011). Les animaux atteints peuvent ainsi excréter jusqu'à 6 semaines une quantité importante de salmonelles dans les matières fécales, et pendant 4 semaines dans le mucus vaginal en cas d'avortements. Les individus porteurs asymptomatiques du germe assurent la pérennité de l'infection dans le troupeau.

L'avortement à *Salmonella abortus ovis* se produit pendant les six dernières semaines de la gestation. La brebis peut présenter une fièvre et même une diarrhée. Les agneaux en contact avec les brebis avortées peuvent aussi développer une diarrhée, et certains risquent de mourir rapidement de septicémie. Une métrite aigue, parfois mortelle, est observée dans 5 à 7 % des cas (Brugère-Picoux, 2011). La rétention placentaire est rare. Les fœtus ne présentent aucune lésion macroscopique permettant de suspecter une salmonellose. Le laboratoire permet de confirmer l'infection par des examens bactériologiques et sérologiques.

3. La coxiellose

La coxiellose ou fièvre du Queensland (fièvre Q) est une zoonose due à une rickettsie : *Coxiella burnetii*. Il s'agit d'une maladie responsable d'avortements chez les ovins, les caprins et les bovins. Les animaux de compagnie (chats et chiens), les animaux sauvages, les chevaux, les porcs, les léporidés, les rongeurs, les oiseaux et les tiques peuvent aussi héberger la bactérie. Ce germe à Gram négatif se localise dans la mamelle, l'utérus et le placenta. Les animaux sont contaminés par l'intermédiaire soit de tissus infectants (lait, placenta, liquide amniotique, sperme, fèces, urines, etc.), soit d'ectoparasites (tiques) (Brugère-Picaux, 2011). La maladie semble exister dans le monde entier, à l'exception de la Nouvelle-Zélande. *C. burnetii* peut survivre longtemps dans le milieu extérieur. En effet, la bactérie peut survivre plusieurs mois dans les matières fécales desséchées, des déjections de tiques, ce qui explique les risques de transmission par l'inhalation d'aérosols contaminés. *C. burnetii* peut même être transportée dans l'air sur de longues distances. Les ruminants peuvent aussi être contaminés par les tiques, par ingestion ou par voie oculaire (Berri *et al.*, 2002). Les conditions d'élevage, en particulier lors de transhumance, peuvent favoriser la contamination (Brugère-Picaux, 2011).

L'infection est souvent subclinique. Le seul symptôme observé chez la brebis non gestante est une anorexie. L'avortement causé par une placentite est le plus souvent observé près du terme. Des cas de broncho-pneumonies, accompagnés parfois de kératoconjonctivite peuvent être observés mais pour de nombreux ovins, l'infection est inapparente. L'infection peut provoquer la naissance de mort-nés ou de nouveau-nés vivants mais faibles. Seul le laboratoire peut confirmer la fièvre Q (bactérioscopie, sérologie, etc.) (Kovacova *et al.*, 1998).

4. La néosporose

Neospora caninum (*N. caninum*) est un protozoaire qui ressemble à *Toxoplasma gondii* (Dubey, 2003). Ce protozoaire, de découverte relativement récente (années 1980), est considéré actuellement comme cause majeure d'avortement chez les bovins. Le parasite est responsable de lourdes pertes économiques chez les bovins laitiers et à viande partout dans le monde (Larson *et al.*, 2004 ; Goodswen *et al.*, 2013). Cette affection semble moins fréquente chez les petits ruminants, mais elle est aussi moins recherchée.

Chez les ovins, *N. caninum* a été décrit pour la première fois chez un agneau congénitalement infecté en Angleterre (Dubey *et al.*, 1990).

Il a été signalé par la suite dans de nombreux pays tels que l'Amérique du Sud, l'Australie, le Japon et la Suisse (Kobayashi *et al.*, 2001; Koyama *et al.*, 2001; Hassig *et al.*, 2003; Moore, 2005). Son cycle de reproduction n'a été élucidé qu'en 1998, et ce sont les canidés qui disséminent les ookystes (Martin, 2000). Les autres formes connues sont la forme libre et le kyste. La voie placentaire est aussi un mode de transmission. Les avortements causés par *N. caninum* semblent plus fréquents chez les bovins, mais des cas ont été rapportés chez les ovins (Martin, 2000). Les fœtus peuvent être momifiés. Des difformités congénitales liées à la destruction du cerveau et de la moelle épinière sont parfois notées. Le système nerveux central semble être la principale cible. Des lésions peuvent aussi être détectées dans les muscles et le placenta (Martin, 2000).

La détection de *N. caninum* dans les tissus est faite par histopathologie, par immunoperoxydase sur des coupes du cerveau. En histopathologie, les kystes de *Toxoplasma* se distinguent des kystes de *Neospora* par le fait que la paroi du premier a toujours moins de 0,5 µm d'épaisseur, alors que la paroi du second peut avoir jusqu'à 4 µm d'épaisseur (Dubreuil et Arsenault, 2003). L'immunohistochimie serait la méthode diagnostique de choix. La sérologie est un outil de diagnostic très fiable de la condition et non pas de l'avortement.

Chapitre V

Mesures prophylactiques de l'avortement enzootique des brebis

Le contrôle de l'avortement enzootique des brebis fait appel aux traitements antibiotiques, à l'amélioration des pratiques d'élevage, et à l'utilisation des vaccins.

1. Traitements antibiotiques

En matière de chlamydirose abortive, les traitements antibiotiques préconisés sont 2 ou 3 injections intramusculaires d'*oxytétracycline* retard à raison de 20 mg/kg à 15 jours d'intervalle en fin de gestation. La tétracycline est l'antibiotique de choix mais le taux de succès est limité car ces traitements diminuent les avortements mais ne suppriment pas l'excrétion (Rodolakis, 2006). Il est judicieux de traiter les brebis gravides tout au long de la première moitié de la gestation, afin de limiter la sévérité de la placentite.

2. Prévention et contrôle de l'avortement enzootique ovin

A partir des données collectées dans les élevages touchés, un programme de lutte efficace vis-à-vis des maladies abortives et plus particulièrement la chlamydirose abortive ovine doit être mis en place. Celui-ci permettra une adaptation de la prévention et un ciblage des mesures à mettre en place. En effet, deux outils sont disponibles : l'outil sanitaire et les vaccins.

2.1. Prévention

2.1.1. L'outil sanitaire

Les précautions sanitaires et l'hygiène demeurent les mesures les plus efficaces pour prévenir toutes les maladies, y compris les avortements. Il est vrai qu'elles nécessitent un investissement humain continu, mais elles sont à la portée de tous et ne sont pas coûteuses. Ce sont les mesures qui doivent être mises en œuvre en priorité. Ainsi, une bonne conduite d'élevage est primordiale en respectant les points suivants:

- Assurer une alimentation saine et équilibrée,
- Assurer une eau de boisson de qualité,
- Contrôler rigoureusement le parasitisme dans l'élevage,

- Assurer le bien être aux animaux dans un bâtiment d'élevage adapté (surface, volume, aération, litière, etc.),
- Gérer de manière rigoureuse les introductions dans l'élevage :
 - ✓ Le statut sanitaire du cheptel d'origine des animaux introduits doit être connu.
 - ✓ Les animaux introduits doivent être isolés et maintenus en quarantaine avant leur fusion avec le cheptel.
 - ✓ Un dépistage adapté doit être réalisé.
- Contrôler la circulation des animaux nuisibles et des réservoirs potentiels des infections abortives.

2.1.2. Les vaccins

Les vaccins sont nécessaires, mais sont souvent insuffisants. Ils doivent être considérés comme des outils complémentaires et ne remplacent jamais les mesures de précautions sanitaires.

Dans un premier temps, un vaccin inactivé a été développé puis mis sur le marché en France (Chlamyvox FQ[®]) mais celui-ci n'a pas assuré de protection efficace contre le portage et l'excrétion de *Chlamydia*. Des phases d'infection endémiques sont alors apparues (Rodolakis et Souriau, 1979 et 1980 ; Rodolakis et Bernard, 1984 ; Chalmers *et al.*, 1997 ; Nietfeld, 2001 ; Andersen, 2004 ; Caro *et al.*, 2009).

La découverte d'une souche *C. abortus* mutante thermosensible hypovirulente en 1979 a permis de commercialiser un vaccin vivant qui protège efficacement les brebis contre l'infection. Cette souche fut obtenue par mutagenèse de la souche de référence AB 7 après traitement à la N-méthyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine (10 µg/ml) de cultures cellulaires McCoy inoculées 24h avant (Rodolakis et Souriau, 1983 ; Rodolakis et Bernard, 1984 ; Plommet, 1997 ; Andersen, 2004). La souche AB 7 a été isolée à partir d'un placenta de brebis avortée et fut entretenue depuis par des mises en culture en série sur des œufs embryonnés de poules (Faye *et al.*, 1972). La souche vaccinale thermosensible 1B se multiplie normalement de 35 à 38° C sur culture de cellules McCoy (température permissive) mais cent fois moins que la souche sauvage AB 7 à 39,5° C (température restrictive) qui correspond à la température corporelle des brebis. La souche mutante se multiplie dans les organes internes des animaux inoculés mais persiste moins longtemps. Elle est aussi dix fois moins virulente que la souche sauvage AB 7 (Rodolakis, 1998). La stabilité de ce vaccin vivant a été démontrée par l'évaluation de la virulence de la souche

mutante 1B sur modèle murin, après des passages successifs de cette souche sur des cultures cellulaires, des souris et des agneaux (Rodolakis *et al.*, 1998). Ce vaccin vivant fut commercialisé au Royaume Uni dès 1993 sous l'appellation « Ovilis Chlamydia® ».

Le vaccin vivant thermosensible (*CEVAC ChlamydiaTM CEVA Sante Animale* Libourne ou *Ovillis® Enzoovac Intervet* Angers) développé à l'INRA protège efficacement la brebis pendant au moins 3 gestations (Rodolakis, 2006). Ce vaccin a prouvé son efficacité contre toutes les souches testées (Rodolakis et Bernard, 1984 ; Chalmers *et al.*, 1997) y compris les souches à variations antigéniques (Bouakane *et al.*, 2003) ou celles isolées des bovins (Rodolakis et Souriau, 1987 ; Rodolakis, 2006). Cependant, le vaccin ne traite pas les femelles infectées latentes qui peuvent avorter après la vaccination.

Quoique l'utilisation d'un vaccin tué réduise l'incidence de l'avortement, elle ne diminue pas le nombre de porteurs lors de la mise-bas. Ce phénomène provoque un cycle endémique de l'infection menant à des conséquences épidémiologiques importantes, comme la sélection de souches plus résistantes ou antigéniquement différentes d'où l'importance d'utiliser un vaccin vivant atténué (Aitken, 1986). Contrairement à ce que l'on observe avec la toxoplasmose, la campylobactériose ou la border disease, la primo infection des agnelles dans un environnement contaminé par *C. abortus* n'entraîne pas d'immunité de prémunition, bien au contraire (Aitken, 2000). Une immunité efficace n'est obtenue qu'après une épreuve virulente massive et brutale (Rodolakis et Souriau, 1980). La prévention passe donc par la vaccination avec un vaccin vivant atténué, seul type de vaccin capable de reproduire l'immunité post-infection (Plommet, 1997 ; Rocchi *et al.*, 2009).

La vaccination annuelle est préconisée dans les zones endémiques quatre à six semaines avant la saillie des brebis, avec une seconde dose un mois plus tard (Dubreuil et Arsenault, 2003). On recommande de vacciner tous les animaux la première année puis seulement les agnelles de renouvellement les années suivantes (Rodolakis *et al.*, 1998). En pratique, les animaux sont vaccinés un à deux mois avant la lutte. Si on considère que le taux de renouvellement est d'environ 25 %, le cheptel est protégé au bout de quatre ans. Une autre stratégie consiste à ne vacciner que les agnelles, cela prolonge alors la durée nécessaire à la couverture vaccinale totale du troupeau. Le premier schéma a l'avantage de limiter l'excrétion par les brebis infectées latentes et la dissémination de l'infection parmi les adultes encore naïves.

La vaccination contre la chlamyphilose avec un vaccin vivant est donc la seule solution à l'assainissement d'un troupeau infecté mais elle atteint ses limites tant qu'il subsiste des animaux infectés latents (Bouakane *et al.*, 2005). Un rappel trois ans après la primo vaccination est conseillé (Aitken, 2000, Entrican *et al.*, 2001 ; Bouakane *et al.*, 2005).

2.2. Contrôle de l'avortement enzootique des brebis dans un élevage infecté

Dans un élevage infecté par *C. abortus*, il est indispensable de suivre les précautions suivantes afin de contrôler sa dissémination au sein du troupeau et sa diffusion aux élevages voisins :

- Dès le début de l'épidémie, avertir le voisinage,
- Intervenir avec des gants car il s'agit d'une zoonose,
- S'engager vite dans une démarche diagnostique avec le vétérinaire pour identifier la cause,
- Appliquer strictement les mesures sanitaires et d'hygiène afin de réduire au maximum la dissémination de l'agent infectieux à l'intérieur et à l'extérieur de l'élevage :
 - ✓ Isoler les brebis avorteuses, détruire les produits d'avortement contaminés (avortons, placentas) et ne pas les laisser trainer et ne pas les donner aux chiens.
 - ✓ Détruire les litières et désinfecter les cases souillées.
 - ✓ Ne pas faire adopter les agneaux bien portants à des brebis avortées.

Quoi qu'elles soient difficiles, contraignantes, ces mesures sont les seules capables de réduire la pression d'infection et ce sont celles qui conditionnent l'efficacité de la vaccination. Efficace sur les animaux sains, le vaccin devient partiellement ou totalement inefficace sur les animaux fraîchement infectés (jeunes agneaux et agnelles, brebis en fin de gestation).

Deuxième partie

« Etude expérimentale »

Chapitre I.

*Dépistage sérologique des infections abortives
chez les brebis dans la wilaya de Constantine :
Chlamydiose, fièvre Q, brucellose, salmonellose
abortive et néosporose*

Chapitre I

Dépistage sérologique des infections abortives chez les brebis dans la wilaya de Constantine : chlamydie, fièvre Q, brucellose, salmonellose abortive et néosporose

1. Introduction

L'élevage ovin ne cesse d'évoluer considérablement ces dernières années. Les maladies infectieuses abortives constituent un facteur limitant du rendement de la production et concourent à une situation de déficit en matière d'élevage.

Les avortements ovins apparaissent généralement en série, en fin de gestation et peuvent prendre un aspect catastrophique. Ces infections ont à la fois des effets directs sur les animaux (avortement, infertilité, diminution de la production laitière et parfois mort de la brebis) et des effets indirects sur les productions animales (coût d'entretien des animaux non producteurs, coût des interventions vétérinaires et celui de la reconstitution des cheptels).

Les avortements sont principalement d'origine bactérienne ou parasitaire. Connaître la situation épidémiologique des élevages et des individus vis-à-vis des agents abortifs constitue une étape primordiale et indispensable à toute tentative de diagnostic et de mise en place d'une thérapeutique curative et stratégie préventive adaptée. L'étude des agents abortifs et leur prophylaxie trouve également son importance dans le risque sanitaire pour la santé humaine surtout que la plupart des affections abortives sont zoonotiques comme la fièvre Q, la chlamydie et la brucellose. Une actualisation du portrait sanitaire des troupeaux s'impose afin de cibler des priorités pour le transfert des connaissances et d'orienter les thèmes de projets de recherche.

2. Objectifs de l'étude

Cette étude s'intéresse aux principales maladies abortives au travers d'une étude séro-épidémiologique. L'objectif principal est de faire le point sur cinq agents abortifs afin d'avoir une idée plus précise sur leur séoprévalence encore mal connue dans la wilaya de Constantine. Ainsi, cette étude vise les objectifs spécifiques suivants :

- Estimer à l'échelle individuelle la séoprévalence de cinq maladies abortives : chlamydie, fièvre Q, brucellose, salmonellose abortive et néosporose chez les brebis dans la wilaya de Constantine,
- Déterminer le statut immunitaire des élevages ovins vis-à-vis des agents abortifs recherchés,
- Réaliser une analyse préliminaire des facteurs associés à la séopositivité des animaux,
- Identifier les infections prédominantes dans la zone d'étude.

3. Présentation de la zone d'étude

3.1. Localisation géographique et superficie

La zone d'étude regroupe les 12 communes de la wilaya de Constantine, répartis entre 9 daïra (figure 14). Elle a une superficie de 2297,2 km². Située en plein centre de l'est algérien, Constantine est une métropole intérieure et méditerranéenne qui polarise les hauts plateaux. La wilaya est située à environ 89 kilomètres de la côte méditerranéenne. Elle est bâtie sur un rocher situé sur les deux rives d'Oued Rhumel, elle est ainsi cernée par de véritables obstacles naturels. Les repères géographiques montrent que la région n'est pas homogène par rapport à sa position et celui du niveau de la mer (698 mètres d'altitude). Elle est limitée au nord par la wilaya de Skikda, à l'est par la wilaya de Guelma, à l'ouest par la wilaya de Mila et au sud par la wilaya de Oum El Bouaghi (figure 15).

3.2. Climat et pluviométrie

La région a un climat méditerranéen avec des étés chauds et secs et des hivers froids et humides. En été, la température est comprise entre 25° et 40° C. Les températures moyennes en hiver sont entre 0° et 12° C. La pluviométrie annuelle varie entre 500 mm et 700 mm.

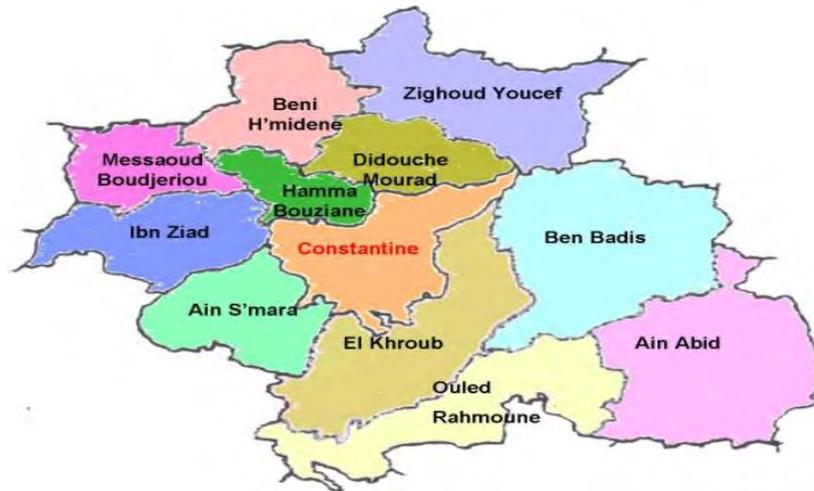


Figure 14 : Carte représentative des douze communes de la wilaya de Constantine



Figure 15 : Carte représentative de Constantine et des wilayas voisines

3.3. Hydrographie

Les plus importants cours d'eau de Constantine sont Oued Rhumel, Oued Boumerzoug et Oued Smendou où convergent plusieurs affluents temporaires. Le Rhumel prend sa source dans les monts de Ferdjioua (Mila). Il pénètre sur les plateaux de Constantine, où sa vallée décrit une série de sinuosités, puis se resserre très sensiblement au nord de Ain Smara où il se forme alors une boucle presque fermée et s'infiltré entre les tables calcaires du Djebel El Hadja et du plateau de Ain El Bey en conservant une direction générale sud-ouest nord-est. Le Rhumel se dirige ensuite vers la cité Boussouf à l'altitude et en voisinage immédiat des ravins.

Son lit dessine encore plusieurs courbes, puis devient très étroit au lieu dit "les arcades romaines". Le bas Rhumel franchit les chaînes numidiques dans les gorges profondes puis va se jeter dans la mer à l'ouest du golf de Jijel. Son principal affluent, est l'oued-Boumerzoug qui prend sa source dans la région de Ain M'Lila dont les eaux sont largement exploitées pour l'irrigation, fertilisent les terres. L'important groupement thermal de Ain Fesguia situé vers la tête de la vallée, a été capté et alimente en eau potable la ville de Constantine, bâtie plus près du confluent de Boumerzoug et du Rhumel.

4. Matériel et méthodes

4.1. Animaux

La présente étude a inclus 226 prélèvements provenant de 39 élevages d'ovins issus de douze communes de la wilaya de Constantine. L'ensemble des élevages ovins sont situés entre 36° 17' de latitude et 6° 37' de longitude. Les animaux ont entre douze mois et 59 mois d'âge et sont répartis comme suit : 13 (5,8 %) ont de 12 à 23 mois d'âge ; 90 (39,8 %) ont de 24 à 35 mois ; 101 (44,7 %) ont de 36 à 47 mois et 22 (9,7 %) ont de 48 à 59 mois (tableau 2).

Tableau 2 : Distribution des brebis prélevées selon l'âge

Age des brebis (mois)	Nombre de brebis (%)
12 – 23	13 (5,8 %)
24 – 35	90 (39,8 %)
36 – 47	101 (44,7 %)
48 – 59	22 (9,7 %)
Total	226

Le tableau 3 présente la répartition des brebis prélevées par troupeau et par commune.

Tableau 3 : Répartition des brebis prélevées par troupeau et par commune

	Communes	n	N	Numéros des troupeaux
1	Ain Abid	4	3	15, 33, 37
2	Ain Smara	9	1	13
3	Béni-Hmidane	33	6	1, 2, 3, 4, 5, 26
4	Constantine	8	2	12, 48
5	Didouche Mourad	4	2	22, 24
6	Hamma Bouziane	6	2	11,14
7	Ibn Badis	6	1	32
8	Ibn Ziad	34	4	27, 40, 41, 49
9	El Khroub	46	9	31, 38, 44, 45, 46, 47, 52, 53, 54
10	Messaoud Boudjriou	11	3	10, 29, 30
11	Ouled Rahmoune	39	3	42, 43, 50
12	Zighoud Youcef	26	3	9, 23, 28
	Total	226	39	

N= nombre de troupeaux prélevés; n= nombre de brebis prélevées

4.2. Période de l'étude

La collecte de données sur les brebis, sur les pratiques de l'élevage ainsi que les prélèvements des échantillons sanguins ont été effectués sur une période s'étalant de mars 2011 à janvier 2012.

4.3. Conception de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale. Un échantillon représentatif de brebis âgées entre 12 et 59 mois a été prélevé par sondage aléatoire. La taille de l'échantillon a été calculée selon la formule suivante, avec une prévalence attendue de 10 % et un intervalle de confiance de 95 %:

$$N = 4 PQ/L^2$$

Où : $4 = (1,96)^2$ est l'erreur alpha ; P est la prévalence attendue de la maladie ; $Q = 1-P$ et L est la précision requise ou marge d'erreur (0,05 ou 0,06). La taille d'échantillon minimale suffisante pour une précision adéquate est estimée à 100.

Puisqu'il s'agit de maladies infectieuses et afin d'augmenter la puissance de l'analyse statistique, la taille de l'échantillon a été multipliée 5 fois.

Le nombre de cheptels ovins à échantillonner a été calculé en divisant le nombre total d'échantillons par le nombre d'animaux à prélever dans chaque troupeau (Martin *et al.*, 1987). 54 troupeaux ont été sélectionnés de manière aléatoire. La taille des troupeaux variait de 20 à 500 têtes.

A l'échelle individuelle, la taille de l'échantillon a été calculée pour chaque troupeau de manière à pouvoir détecter l'existence de l'infection. Les calculs ont été effectués conformément à la formule couramment utilisée dans les enquêtes épidémiologiques vétérinaires (Thrusfield, 2007).

$$n = \left[1 - (1 - p)^{1/d} \right] \times \left(N - \frac{d}{2} \right) + 1$$

Où : n est la taille de l'échantillon, p est la probabilité de détection d'au moins une brebis séropositive, N est la taille du cheptel et d est le nombre de brebis séropositives dans le troupeau.

La probabilité de détection d'au moins une brebis séropositive dans un troupeau a été déterminée sur la base d'un intervalle de confiance de 95 % ($p=0,95$), tandis que le nombre de brebis séropositives dans chaque troupeau (d) a été calculé pour une prévalence troupeau attendue de 10 % (McQuiston et Childs, 2002 ; Čisláková *et al.*, 2007).

Ainsi, 10 à 30 échantillons de sang ont été convenablement prélevés de chaque troupeau. Le nombre d'animaux à prélever de chaque commune de la wilaya était proportionnel à l'effectif du cheptel ovin dans la commune correspondante.

4.4. Collecte des données épidémiologiques

Un questionnaire structuré et pré-testé a été élaboré. Il contient des questions clairement codées, des questions à choix multiples et des questions ouvertes (annexe 6). Le questionnaire a été soumis au préalable à un pré-test pilote.

Le pré-test a été mené avec un groupe de dix éleveurs n'ayant pas participé à l'enquête afin d'améliorer la clarté, l'ordre des questions et pour lever toute ambiguïté. Le questionnaire a été fourni aux éleveurs avant de réaliser les prélèvements.

Les données individuelles recueillies sur chaque brebis sont : l'âge, la source (née dans la ferme, achetée du marché local), le nombre de mises bas, les antécédents d'avortement et de mortinatalité, le stade d'avortement, l'éventuel diagnostic de laboratoire de l'étiologie des avortements, les signes associés aux avortements, le statut vaccinal, les antécédents pathologiques, les dystocies, les rétentions placentaires, les mammites, les métrites (annexe 6).

Toutefois, les informations consignées concernant le statut sanitaire et les pratiques de gestion de l'élevage sont : la localisation géographique (commune), l'effectif total du troupeau, le mode de reproduction, le taux d'avortement, le taux de mortalité chez les jeunes agneaux avant sevrage, l'infertilité, la naissance d'agneaux faibles, le traitement des animaux nouvellement achetés, la disponibilité des services vétérinaires, les méthodes de nettoyage du bâtiment d'élevage, l'usage de désinfectants, la circulation d'animaux domestiques et nuisibles dans l'élevage (chats, chiens, oiseaux, rats), les visiteurs de la ferme (vétérinaires, ouvriers de fermes voisines), le personnel de la ferme visitant les élevages voisins, l'alimentation, l'eau d'abreuvement (annexe 6).

4.5. Prélèvements de sang

Des échantillons de sang de 5 ml ont été prélevés à la veine jugulaire des brebis sur tubes secs stériles de type Vacutainer, à l'aide d'aiguilles jetables. Les prélèvements ont été aussitôt acheminés sur glace au laboratoire. Les sérums ont été extraits par centrifugation à 1000 x g pendant 10 minutes, aliquotés dans des tubes Eppendorf puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

4.6. Méthodes sérologiques

La recherche des anticorps dirigés contre les cinq agents abortifs ciblés a été réalisée par technique ELISA pour la chlamydie, la coxiellose et la néosporose ; et par séroagglutination pour la brucellose et la salmonellose abortive. Ces tests ont été réalisés au niveau du laboratoire de sérologie du service de pathologie de la reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS), France.

4.6.1. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) indirecte *Chlamydia* spp.

Les anticorps vis-à-vis de *Chlamydia* spp. ont été recherchés par technique ELISA indirecte à l'aide du kit LSIVET Ruminant Serum Chlamydiosis (LSI, France) selon le principe suivant :

Les anticorps spécifiques à *Chlamydia* spp. éventuellement présents dans les échantillons se lient à l'antigène. Après lavage, un conjugué anti-ruminant marqué à la peroxydase est ajouté pour aller se fixer sur les anticorps préalablement fixés sur les microcupules.

Le conjugué non fixé est éliminé par lavage avant addition d'un substrat chromogène. L'apparition d'une coloration est la conséquence de l'oxydation du substrat par la peroxydase du conjugué. L'apparition d'une coloration jaune indique un échantillon positif. La coloration de chaque puits est proportionnelle au taux d'anticorps anti-*Chlamydia* présents dans l'échantillon dilué. Après arrêt de la réaction, la lecture des résultats (densité optique) est réalisée par un lecteur de plaques ELISA. Les sérums de contrôle positif et négatif à *Chlamydia* spp. sont fournis avec le kit. Le test a été réalisé en suivant les instructions du fabricant. Le mode opératoire et l'interprétation des résultats sont détaillés en annexe 2.

4.6.2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) indirecte *Coxiella burnetii*

La présence des anticorps dirigés contre *Coxiella burnetii* a été révélée par le biais du kit LSIVET Ruminant Milk/Serum Q Fever (LSI, France). Le test immunoenzymatique a été réalisé en suivant les instructions du fabricant. Le mode opératoire et l'interprétation des résultats sont détaillés en annexe 3.

4.6.3. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) competitive *Neospora caninum*

La présence des anticorps anti-*Neospora caninum* a été révélée par ELISA compétitive à l'aide du kit Bio-X Diagnostics (BIO K 218). Il s'agit d'un kit pour la détection des anticorps dans le sérum.

Les microplaques à 96 puits sont pré sensibilisées par une protéine recombinante SRS2 de *Neospora caninum* produite par *E. coli*. Les sérums sanguins préalablement dilués sont déposés dans les cupules de la microplaque. Après une incubation de deux heures et une étape de lavage, le conjugué est ajouté. Ce dernier est un anticorps monoclonal spécifique de la protéine SRS2 de *Neospora caninum* couplé à la peroxydase. Après une période d'incubation et une étape de lavage de la préparation, la solution de révélation (TMB monocomposant) est ajoutée.

Ce chromogène présente le double avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérigène. L'interprétation de la coloration est inversement proportionnelle au titre sérique de l'échantillon à tester. Les sérums de contrôle positif et négatif sont fournis avec le kit. Le test a été réalisé selon les instructions du fabricant. Le mode opératoire et l'interprétation des résultats sont détaillés en annexe 4.

4.6.4. Recherche des anticorps anti-*Salmonella abortus ovis* par séroagglutination lente

Cette technique de séroagglutination lente en micro méthode développée par Sanchis *et al.* (1985) consiste en la recherche et titrage des agglutinines salmonelliques dans les sérums incubés pendant 18 heures à 37° C, après mélange avec une suspension d'antigène colorée d'antigène H de *Salmonella abortus ovis* (Fabrication locale, étalonnée sur celle de l'AFSSA de Sophia Antipolis). Ce diagnostic nécessite outre les sérums à tester, l'antigène et une solution saline (PBS). Ainsi, une dilution sérique sérielle du 1/10^{ème} au 1/320^{ème} (raison 2) est effectuée en PBS (volume: 25 µl).

Ensuite, 25 µl d'antigène prêt à l'emploi est réparti dans toutes les cupules de la microplaque. Celle-ci est recouverte et incubée pendant 18 heures à 37° C. La lecture des résultats se fait par l'observation de la présence ou l'absence d'agglutinats au fond de chaque cupule :

- Agglutination complète: présence d'agglutinats diffus au fond de la cupule.
- Pas d'agglutination: présence d'un culot d'antigène au fond de la cupule.

L'interprétation des résultats se fait comme suit :

- Présence d'agglutinats: réaction positive notée de 1+ (agglutination 25 %) à 4+ (agglutination 100 %) ou de + à ++++.
- Pas d'agglutination: réaction négative notée –.

Le seuil habituel chez les bovins, ovins, caprins : animal positif à partir de 2+ au 1/160^{ème} sérique.

4.6.5. Recherche des anticorps anti-*Brucella melitensis* par séroagglutination rapide sur lame

La séroagglutination rapide sur lame ou épreuve de l'antigène tamponnée pour la détection des anticorps anti-*Brucella*, consiste à mettre en contact un volume de sérum avec l'antigène coloré au Rose Bengale (BENGATEST, Synbiotics Corporation®).

Ainsi, sur une lame de microscope, 30 µl de sérum à tester et une goutte d'antigène sont déposés puis mélangés à l'aide d'une baguette. La lame est agitée de façon orbitale pendant 4 minutes. L'agglutination se produit immédiatement et le résultat se lit en quelques minutes.

4.7. Analyse statistique

L'exploitation statistique des données recueillies à partir du questionnaire et des résultats des analyses sérologiques a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS version 20 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Ainsi, les variables ont été codées, enregistrées puis analysées avec un intervalle de confiance de 95 %. La variable dépendante, étant le résultat de l'analyse sérologique de chlamydie, fièvre Q, salmonellose abortive, brucellose et néosporose. Celles-ci ont été codées 0 pour un échantillon négatif et 1 pour un échantillon positif. Les variables explicatives, indépendantes ont été codées en deux catégories pour ce qui est des questions à réponses oui ou non ; 0 pour non et 1 pour oui. Pour les questions à choix multiples, les catégories de réponses ont été codées de 0 à 5. Une analyse univariée des facteurs associés à la séropositivité vis-à-vis des agents abortifs étudiés a été effectuée par le biais du test du Khi-deux de Pearson (χ^2). Une valeur $p < 0,05$ est considérée statistiquement significative.

5. Résultats

5.1. Prévalence des maladies abortives chez les brebis

A l'échelle individuelle, les résultats obtenus montrent une prédominance de la chlamydie avec un taux de séropositivité de 45,6 % (103/226), suivie par la fièvre Q avec 12,4 % (28/226). Les résultats sérologiques sont présentés dans le tableau 4 et la figure 16. Les anticorps anti-*Salmonella abortus ovis* et anti-*Neospora caninum* ont été mis en évidence respectivement dans 8,4 % et 2,2 % des échantillons. Une faible prévalence de la brucellose (0,4 %) a été également observée (1/218).

Tableau 4 : Résultats du dépistage sérologique des maladies abortives sur sérums de brebis en provenance de la wilaya de Constantine

Agents abortifs	Nombre de brebis testées	Nombre de brebis Séropositives	Nombre de brebis Séronégatives	Taux de séropositivité (%)
<i>Chlamydia</i> spp.	226	103	123	45.6
<i>Coxiella burnetii</i>	226	28	198	12.4
<i>Salmonella abortus ovis</i>	226	19	207	8.4
<i>Neospora caninum</i>	183	4	179	2.2
<i>Brucella melitensis</i>	218	1	217	0.4

La figure 16 présente la prévalence des maladies abortives chez les brebis dans la wilaya de Constantine.

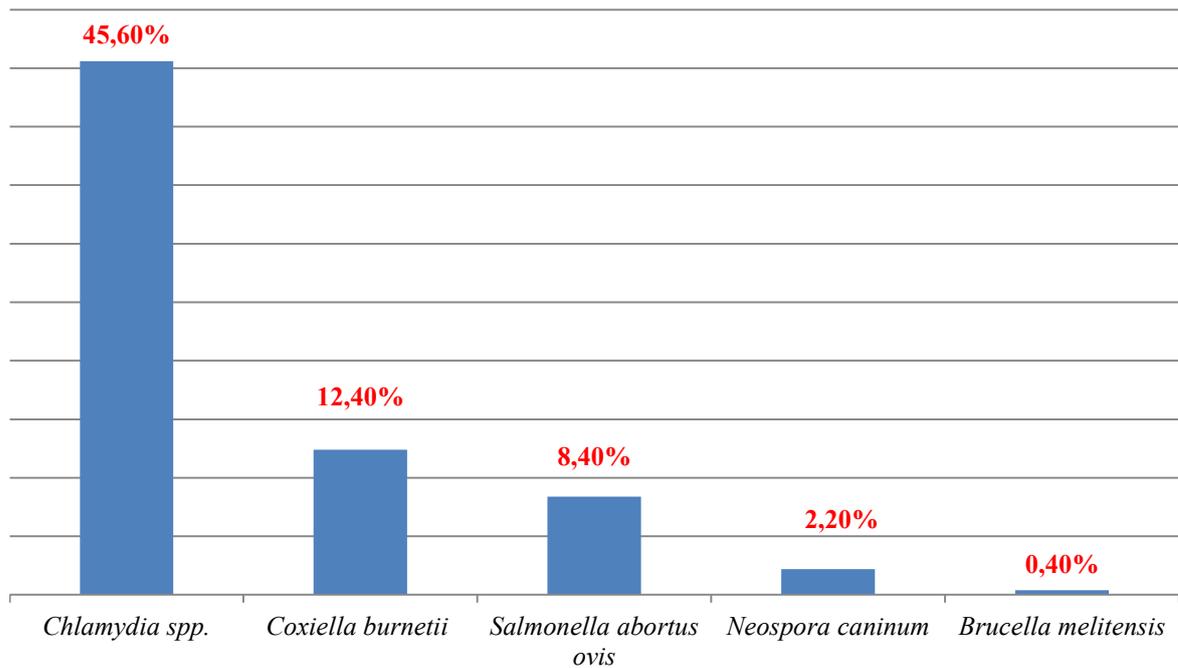


Figure 16 : Prévalence des anticorps vis-à-vis des agents abortifs chez les brebis dans la wilaya de Constantine

5.2. Répartition des maladies abortives en fonction des élevages

Un troupeau est considéré séropositif lorsqu'il contient au moins une brebis séropositive vis-à-vis d'une infection abortive. Ainsi, la répartition des troupeaux montre que 33 (84,6 %) sur 39 ont présenté des sérologies positives vis-à-vis de la chlamydie seule ou en association à d'autres agents abortifs. Le pourcentage de troupeaux séropositifs à la fièvre Q s'élève à 35,9 % des élevages. Les autres maladies abortives rencontrées à de faibles prévalences sont : la salmonellose abortive (12,8 %), la néosporose (5,1 %) et la brucellose (2,5 %) (tableau 5). Il faut souligner la présence de 6 élevages séronégatifs aux cinq maladies abortives, soit une fréquence de 15,4 %.

Tableau 5 : Résultats sérologiques des élevages vis-à-vis des agents abortifs

Agent abortif	Nombre de troupeaux séropositifs (%)
<i>Chlamydia spp.</i>	33 (84,6 %)
<i>Coxiella burnetii</i>	14 (35,9 %)
<i>Salmonella abortus ovis</i>	5 (12,8 %)
<i>Neospora caninum</i>	2 (5,1 %)
<i>Brucella melitensis</i>	1 (2,5 %)

Le tableau 6 donne la répartition des élevages ovins séropositifs à un seul agent abortif.

Tableau 6 : Répartition des élevages ovins séropositifs à un seul agent abortif

Réponse sérologique	Nombre de troupeaux (%)
Chlamydieuse	16 (41,02)
Fièvre Q	0 (0)
Salmonellose	0 (0)
Brucellose	0 (0)
Néosporose	0 (0)
Total	16 (41,02)

5.3. Réponse sérologique multiple

Sur les 39 élevages enquêtés, 16 (41 %) troupeaux ont présenté des sérologies positives vis-à-vis de la chlamydieuse. En revanche, 17 (43,6 %) troupeaux ont montré des sérologies positives pour 2, 3 ou 4 agents abortifs. Le tableau 7 présente les différents types d'infections associées.

L'association fièvre Q-chlamydieuse est la plus fréquente, représentée par 28,2 % des élevages. Les autres associations sont représentées par : salmonellose-chlamydieuse (5,1 %), salmonellose-fièvre Q-chlamydieuse (5,1 %), salmonellose-chlamydieuse-néosporose (2,5 %) et fièvre Q-chlamydieuse-brucellose-néosporose (2,5 %).

Tableau 7 : Répartition des élevages présentant un statut immunitaire multiple vis-à-vis de plusieurs agents abortifs

Réponse sérologique multiple	Nombre de troupeaux (%)
Fièvre Q-chlamydieuse	11 (28,2)
Salmonellose-fièvre Q-chlamydieuse	2 (5,1)
Salmonellose-chlamydieuse	2 (5,1)
Salmonellose-chlamydieuse-néosporose	1 (2,5)
Fièvre Q-chlamydieuse-brucellose-néosporose	1 (2,5)
Total	17 (43,6 %)

Le tableau 8 indique la répartition des brebis séropositives vis-à-vis des agents abortifs par troupeau et par commune.

Tableau 8 : Répartition des brebis séropositives par troupeau et par commune

Troupeau N°	Commune	SAL	FQ	CHL	BRU	NEO
1	Béni-Hmidane	–	1	2	–	–
2	Béni-Hmidane	–	4	1	–	–
3	Béni-Hmidane	–	1	1	–	–
4	Béni-Hmidane	–	–	2	–	–
5	Béni-Hmidane	–	–	3	–	–
9	Zighoud Youcef	–	1	1	–	–
11	Hamma Bouziane	–	–	2	–	–
12	Constantine	–	–	2	–	–
13	Ain Smara	3	4	8	–	–
14	Hamma Bouziane	–	–	2	–	–
15	Ain Abid	2	–	2	–	–
22	Didouche Mourad	–	–	2	–	–
26	Béni-Hmidane	–	2	2	–	–
27	Ibn Ziad	–	–	1	–	–
28	Zighoud Youcef	1	–	1	–	–
30	Messaoud	–	–	1	–	–
31	Boudjriou	–	–	5	–	–
32	El Khroub	–	–	3	–	–
33	Ibn Badis	–	–	3	–	–
33	Ain Abid	–	1	1	–	–
38	El Khroub	–	–	1	–	–
40	Ibn Ziad	1	–	3	–	1
41	Ibn Ziad	–	2	8	1	3
42	Ouled Rahmoune	–	2	9	–	–
44	El Khroub	–	–	2	–	–
45	El Khroub	–	3	7	–	–
46	El Khroub	–	2	3	–	–
47	El Khroub	2	3	9	–	–
48	Constantine	–	–	4	–	–
49	Ibn Ziad	–	1	2	–	–
50	Ouled Rahmoune	–	–	4	–	–
52	El Khroub	–	–	2	–	–
53	El Khroub	–	–	4	–	–
54	El Khroub	–	1	2	–	–

SAL: salmonellose; CHL: chlamydie; NEO: néosporose; BRU: brucellose; FQ: fièvre Q; – : séronégative.

 Séropositivité vis-à-vis d'un seul agent abortif  Séropositivité multiple

A l'échelle individuelle, 29 brebis présentent des anticorps dirigés contre deux à trois agents abortifs à la fois (tableau 9). 18 brebis ont montré une association de sérologie positive pour la fièvre Q et la chlamydie. En revanche, seulement 2 brebis sont simultanément séropositives à la chlamydie, la fièvre Q et la salmonellose abortive et (1) brebis séropositives à la chlamydie, la néosporose et la brucellose (tableau 9). Cependant, aucune brebis n'est séropositive aux cinq agents abortifs à la fois.

Il a été noté que la majorité des brebis présentant une poly infection de type chlamydie-fièvre Q sont âgées de 2 ans (34,5 %) et 3 ans (24,1 %). Tandis que les brebis présentant des anticorps à trois agents abortifs à la fois sont âgées de 3 ans et plus (tableau 9).

Tableau 9 : Distribution des brebis séropositives à deux agents abortifs ou plus selon l'âge et par commune

Brebis N°	Commune	Age	<i>S. abortus ovis</i>	<i>Chlamydia spp.</i>	<i>Coxiella burnetii</i>	<i>N. caninum</i>	<i>B. melitensis</i>
8	Ibn Ziad	2 ans	+	+++	-	-	-
14	Ibn Ziad	2 ans	-	++	+++	-	-
16	Ibn Ziad	3 ans	-	-	+	+	-
23	Ibn Ziad	3 ans	-	++++	-	+	+
29	Ibn Ziad	3 ans	-	++++	+	-	-
55	El Khroub	3 ans	-	+++	++++	-	-
56	El Khroub	2 ans	-	+++	+	-	-
62	El Khroub	2 ans	-	++++	+	-	-
69	El Khroub	3 ans	-	+	+	-	-
72	El Khroub	3 ans	-	+	++++	-	-
84	El Khroub	4 ans	+	+++	++++	-	-
86	El Khroub	3 ans	+	+	-	-	-
93	El Khroub	4 ans	-	++++	+	-	-
103	El Khroub	2 ans	-	++	++++	-	-
129	Ouled Rahmoune	2 ans	-	+	+	-	-

146	Ouled Rahmoune	3 ans	-	+++	+	-	-
175	Zighoud Youcef	3 ans	-	+	++	-	-
187	Zighoud Youcef	2 ans	+	+++	-	-	-
190	Ain Smara	3 ans	-	++	++++	-	-
208	Ain Smara	2 ans	-	++++	+	-	-
211	Ain Smara	2 ans	+	+	++++	-	-
213	Ain Smara	2 ans	-	+	++	-	-
214	Ain Smara	3 ans	+	+++	-	-	-
216	Ain Smara	2 ans	+	+	-	-	-
217	Ain Smara	2 ans	-	++++	++	-	-
218	Ain Smara	2 ans	-	++	++++	-	-
219	Ain Abid	2 ans	-	+	++	-	-
225	Ain Abid	3 ans	+	++	-	-	-
226	Ain Abid	2 ans	+	++++	-	-	-

5.4. Relation entre la séropositivité des brebis vis-à-vis de *Chlamydia* spp. et *Coxiella burnetii*

L'analyse univariée par le test de Khi-deux de Pearson a révélé une différence significative ($p < 0,01$) entre la séropositivité à *Coxiella burnetii* et *Chlamydia* spp. Parmi les 28 sérums séropositifs à *Coxiella burnetii*, 20 d'entre eux (71,4 %) contiennent aussi des anticorps anti-*Chlamydia* spp. (tableau 10).

Tableau 10 : Distribution des brebis séropositives et séronégatives à *Chlamydia* spp. et *Coxiella burnetii*

		<i>Coxiella burnetii</i>		Total (%)
		No Séropositive (%)	No Séronégative (%)	
<i>Chlamydia</i> spp.	Séropositive	20 (71,4)	8 (28,6)	28 (12,4)
	Séronégative	83 (41,9)	115 (58,1)	198 (87,6)
	Total (%)	103 (45,6)	123 (54,4)	226

Valeur du Khi-deux de Pearson 8,612 ; $p = 0,004$.

5.5. Facteurs significativement associés à la séropositivité vis-à-vis de la fièvre Q

L'analyse univariée a révélé sept facteurs significativement associés à la séropositivité vis-à-vis de *Coxiella burnetii* (tableau 11).

Tableau 11 : Analyse univariée par le test de Khi-deux de Pearson des facteurs associés à la séropositivité des brebis vis-à-vis de *Coxiella burnetii*

Variables	Khi-deux	p
1. Visiteurs de la ferme	10,874	0,004
2. Ouvriers de la ferme visitant des fermes voisines	6,311	0,021
3. Fréquence de désinfection	7,985	0,046
4. Circulation d'animaux nuisibles dans la ferme	9,551	0,049
5. Vaccination contre l'entérotoxémie	12,123	0,002
6. Vaccination contre la clavelée	5,300	0,025
7. Source des animaux	14,297	0,001

5.6. Facteurs associés à la séropositivité vis-à-vis de *Chlamydia* spp.

Le tableau 12 présente les facteurs significativement associés à la présence d'anticorps contre *Chlamydia* spp. ($p < 0,05$). Zéro pour cent (0 %) des cellules ont un effectif théorique inférieur à 5 pour toutes les variables présentées.

Tableau 12 : Analyse univariée par le test de Khi-deux de Pearson des facteurs associés à la séropositivité des brebis vis-à-vis de *Chlamydia* spp. ($p < 0,05$)

Variables	Khi-deux	p
1. Age	11,815	0,008
2. Localisation géographique (commune)	56,342	0,000
3. Historique d'avortement	8,883	0,004
4. Avortement en première gestation	13,807	0,000
5. Stade d'avortement	9,404	0,009
6. Age de la brebis avortée	9,404	0,009
7. Effectif du troupeau d'origine	16,530	0,001
8. Achats extérieurs d'animaux	9,343	0,003
9. Traitement d'animaux achetés avant fusion avec le cheptel	9,417	0,002
10. Visiteurs de la ferme	4,287	0,043
11. Désinfection du bâtiment d'élevage	5,211	0,030
12. Système d'élevage	9,343	0,003
13. Fréquence de désinfection	26,894	0,000
14. Produits désinfectants utilisés	10,178	0,006
15. Distribution régulière de minéraux aux animaux	7,699	0,009
16. Source de l'eau d'abreuvement	12,563	0,006
17. Circulation d'animaux nuisibles dans la ferme	11,449	0,022
18. Présence de locaux de mise-bas	16,451	0,000
19. Vaccination contre la clavelée	6,081	0,015
20. Source des animaux	17,168	0,000
21. Arthrites	4,447	0,040

5.7. Facteurs associés à la séropositivité vis-à-vis de la néosporose, salmonellose abortive et brucellose

L'analyse statistique n'a révélé aucun facteur significativement associé avec la séropositivité vis-à-vis de *Neospora caninum*, *Salmonella abortus ovis* ou *Brucella melitensis* ($p > 0,05$).

6. Discussion

Il s'agit d'une première approche aux infections abortives chez les brebis dans la wilaya de Constantine. Cette étude séro-épidémiologique a permis de dresser un premier bilan sur la séroprévalence de cinq maladies abortives : la brucellose, la chlamydie, la fièvre Q, la salmonellose abortive et la néosporose.

Un questionnaire pré-testé et structuré a été rempli en collaboration avec les éleveurs puis des prélèvements de sang ont été effectués sur un nombre représentatif de brebis sélectionnées de façon aléatoire.

Les prélèvements ont été réalisés de mars 2011 à janvier 2012. Cet intervalle englobe la saison de mises bas. Suite aux informations recueillies sur l'effectif de la population ovine dans les différentes communes de la wilaya de Constantine, cette étude a concerné un échantillon représentatif de cette population. L'échantillon est constitué d'individus tirés au sort qui ont tous la même probabilité d'être sélectionnés, ce qui permet de dire que l'échantillon est représentatif de la population ovine de la région étudiée (Dufour *et al.*, 1997).

Il a été délibérément choisi de ne prélever que les femelles surtout que les femelles sont beaucoup plus abondantes que les mâles.

Avant chaque prélèvement de sang, l'âge des brebis est déterminé par l'examen de la dentition. L'échantillonnage est de type aléatoire et stratifié en fonction de l'âge. Seules les brebis âgées entre 1 et 4 ans ont été prélevées. La majorité des animaux prélevés sont des brebis jeunes. C'est cette catégorie de femelles qui est la plus sensible et exprime le plus les infections abortives (Rekiki *et al.*, 2005).

Le nombre de femelles à prélever de chaque troupeau a été calculé de façon à pouvoir détecter la présence de l'infection tout en prenant en considération l'effectif du troupeau. Il a été choisi d'augmenter le nombre de prélèvements afin d'avoir une connaissance plus fine du statut sanitaire des animaux et d'améliorer la précision de l'échantillonnage. Il faut souligner que l'ensemble des troupeaux concernés par cette enquête appartiennent à des éleveurs qui sollicitent fréquemment les agents de l'inspection vétérinaire notamment lors de campagnes de vaccination.

Etant donné la bonne représentativité de l'échantillon testé, les taux de séropositivité obtenus reflètent avec précision la situation épidémiologique de ces infections de la reproduction chez les ovins de Constantine.

L'échantillon se compose de brebis généralement en bonne santé. Par ailleurs, le recueil des commémoratifs auprès des éleveurs a permis de constater que leurs troupeaux subissent, chaque année quelques cas d'avortements ou des problèmes d'infertilité.

Les signes cliniques associés aux maladies abortives sont peu évocateurs et résident principalement en un épisode abortif. Le diagnostic direct reste difficile à réaliser surtout qu'il demande des prélèvements de bonne qualité, condition difficile à obtenir sur le terrain. D'autre part, l'analyse sérologique indirecte est rapide, de mise en œuvre aisée et a l'avantage de pouvoir détecter les anticorps chez plusieurs animaux à compter du dernier mois de gestation jusqu'à trois mois après un avortement (OIE, 2008). Il s'agit de méthodes multivalentes car à partir d'un seul prélèvement, il est possible de rechercher des anticorps dirigés contre de nombreux agents pathogènes, ce qui a été entrepris dans cette recherche.

La révélation d'une réponse positive par sérologie témoigne que les animaux ont été en contact avec les agents abortifs, ont développé une réponse immunitaire (présence d'anticorps dans le sang), mais ne permet pas d'en déduire le niveau d'infection de la population étudiée.

Il est à noter que pour la distribution des titres d'anticorps, la date du prélèvement influe sur l'estimation du niveau d'infection; les brebis ayant avorté ou ayant été infectées par un agent abortif depuis longtemps risquent de ne pas garder des titres d'anticorps perceptibles (Khammassi-Khabou *et al.*, 2009). En effet, la concentration en anticorps diminue avec l'éloignement de l'épisode infectieux (Fuensalida-Draper et Rodolakis, 1978). Sachant que la reproduction chez les ovins est un évènement saisonnier, la période à risque infectieux se situe autour des périodes de mise bas ou d'avortements.

De plus, pour certaines maladies, il peut y avoir une réactivité des agents pathogènes et une augmentation du titre d'anticorps à la mise bas ou en période d'œstrus comme pour l'avortement enzootique des brebis (Papp *et al.*, 1998). Ainsi, il apparaît que la saison privilégiée pour effectuer des prélèvements sanguins dans le but de détecter les anticorps dirigés contre les agents abortifs ne soit pas la même pour toutes les maladies. Pour la chlamydie abortive, ce serait autour du mois de novembre (Papp *et al.*, 1994 ; Papp et Shewen, 1996)

Lors du dépistage, les animaux qui ont fourni une réponse positive au test n'ont pas toujours été nécessairement infectés (faux positifs). En effet, chaque test est caractérisé par sa spécificité (aptitude à fournir une réponse négative chez un animal indemne) et sa sensibilité (aptitude à fournir une réponse positive chez un animal infecté). D'autre part, la détection dépend du temps écoulé entre l'infection et la prise de sang du fait de la cinétique des anticorps (Lenoble, 2002).

Le seuil de séropositivité des ovins correspond à un processus infectieux probable. Il s'agit en fait, du titre à partir duquel l'animal a probablement eu un contact avec l'agent pathogène, sollicitant ainsi l'immunité (Lenoble, 2002). Toutefois, cela ne préjuge pas du fait que l'animal ait été « malade ». Ainsi, en dessous du seuil de séropositivité, on ne peut pas savoir s'il s'agit d'une réaction contre l'agent pathogène ou d'une interférence : altération du sérum, « bruit de fond » du test ou d'une réaction croisée avec d'autres agents pathogènes. Il peut donc ne pas s'agir de *C. abortus*, par exemple, mais d'une autre bactérie ou d'un ensemble d'agents pathogènes provoquant une séroconversion lors de l'analyse sérologique (Lenoble, 2002). En effet, des réactions croisées peuvent se produire entre plusieurs sérotypes comme pour la salmonellose : croisement entre *S. dublin* et *S. typhimurium* et *S. abortus ovis* (Pardon *et al.*, 1990), ou entre plusieurs espèces du même genre comme pour la chlamydie (croisement entre *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*) (Lenoble, 2002).

La validation d'une méthode sérologique doit donc passer par l'estimation du statut sanitaire de l'animal (infecté ou non infecté), c'est ce qu'on appelle le « gold standard ». L'AFSAA de Nice, considère pour des titres très importants en TFC (>160 pour la salmonellose et >40 pour la chlamydie), on a de fortes chances d'être en présence de *Salmonella abortus ovis* et *C. abortus* (Loison, 1995).

Dans cette étude, des méthodes sérologiques indirectes ont été utilisées pour mesurer la réponse immunitaire des individus. Des taux de séropositivité de 45,6 %, 12,4 % et 8,4 % ont été notés respectivement pour la chlamydie, la fièvre Q et la salmonellose abortive sur l'ensemble des brebis testées. Il en ressort que ces agents pathogènes circulent au sein de la population ovine de Constantine. D'autre part, les anticorps anti-*Neospora caninum* et anti-*Brucella melitensis* étaient respectivement présents dans 2,2 % et 0,4 % des sérums testés.

Les résultats sérologiques ont mis évidence la prédominance de l'infection à ***Chlamydia spp.***, seule ou en association à d'autres germes infectieux (45,6 % des brebis, 84,6 % des troupeaux). La prévalence de la chlamydie chez les brebis testées est supérieure par rapport

aux taux rapportés par divers auteurs : 6,5 % pour Khammassi-Khabou *et al.* (2009) en Tunisie, 21,5 % pour Hamzy-El Idrissi *et al.* (1995) dans la région de Zaer et Moyen Atlas au Maroc et de 15 à 30 % en Mauritanie (Chartier et Chartier, 1988). La chlamydiophilose semble être aussi une cause importante d'avortement en Tunisie (Rekiki *et al.*, 2002; Rekiki, 2004; Rekiki *et al.*, 2006).

La chlamydiose seule ou en association à d'autres germes est dominante dans la majorité des élevages. Le pourcentage de troupeaux infectés (84,6 %) est largement supérieur à celui rapporté par Rahal *et al.* (2011) dans la région de Ksar Boukhari (10 %).

La prédominance de la chlamydiose dans la majorité des troupeaux et brebis testés, seule ou en association à d'autres agents abortifs et en l'absence de foyers d'avortements ; souligne la présence de l'infection de façon enzootique et ancienne.

Pour le diagnostic de la chlamydiose, la recherche des anticorps par le test de fixation du complément demeure la méthode recommandée par l'office internationale des épizooties (OIE). Cependant, ce test présente de nombreux inconvénients. Le TFC ne peut être utilisé pour l'analyse de sérums individuels et doit être fait trois semaines après l'avortement ou la mise-bas (Rodolakis, 2000). En plus, l'interprétation des résultats peut poser problème puisque l'OIE recommande qu'un titre $\geq 1/80$ soit considéré positif, alors qu'un titre ≤ 40 soit considéré douteux. Puisque le TFC utilise des antigènes LPS communs pour les deux espèces de *C. abortus* et *C. pecorum*, cette réaction douteuse est due soit à une réaction croisée avec *C. pecorum* (Longbottom et Coulter, 2003), soit à une infection latente. Deux sérums pris à deux ou trois semaines d'intervalle sont nécessaires pour la recherche d'une séroconversion et donc la mise en évidence d'infection récente, surtout que les anticorps ont une durée de vie de plus de deux ans après une infection (Papp *et al.*, 1994). Alors que le TFC manque de sensibilité et de spécificité, l'ELISA a montré une meilleure sensibilité et a l'avantage de détecter précocement les anticorps, ce qui permet un diagnostic rapide des animaux infectés. Avec l'utilisation d'antigènes recombinants, il est devenu possible de distinguer par ELISA indirecte les réactions croisées de *C. abortus* avec *C. pecorum* (Souriau *et al.*, 1994 ; Longbottom *et al.*, 1998; Buendia *et al.*, 1999; Buendia *et al.*, 2001 ; Longbottom *et al.*, 2001; Longbottom *et al.*, 2002) ; mais aussi avec quelques germes à gram négatif qui peuvent produire des résultats faussement positifs avec le TFC. Plusieurs tests ELISA de compétition ont été aussi développés et reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Salti-Montesanto *et al.*, 1997).

Dans cette étude, la **fièvre Q** représente 12,4 % de l'ensemble des brebis testées. Cette prévalence est comparable à celle rapportée par Hamzy-El Idrissi *et al.* (1995) au Maroc (11,1 %). Les examens sérologiques réalisés confirment la présence de la fièvre Q dans 14 troupeaux (35,89 %) en infection unique et dans 3 troupeaux en association avec d'autres infections. Les taux de séropositivité de *C. burnetii* dans les élevages varient suivant les études : 40 % en Tunisie (Rekiki *et al.*, 2005), de 1 % à 47 % en Allemagne (Lange *et al.*, 1992 ; Hellenbrand *et al.*, 2001 ; Hilbert *et al.*, 2012), de 3 % à 22 % en Turquie (Kilic *et al.*, 2005 ; Kennerman *et al.*, 2010), 11,8 % dans le sud de l'Italie et 31,7 % en Espagne (Capuano *et al.*, 2004). Des taux de 40 %, 70 % et 73 % sont rapportés respectivement par Yahiaoui *et al.* (2013), Rahal *et al.* (2011) en Algérie et Serbezov *et al.* (1999) en Bulgarie.

Les données relatives à la prévalence varient d'une étude à une autre. Cette variation pourrait être attribuée à la conception de l'étude (la taille du cheptel, gestion des troupeaux, le taux d'avortement, nombre d'échantillons testés), les méthodes d'évaluation (prévalence chez les animaux simples contre la prévalence de troupeau) et les méthodes de détection appliquées (CFT, IFAT, ELISA de compétition).

Les techniques les plus utilisées sont les tests sérologiques, avec le TFC comme test de référence (OIE, 2000). Arricau-Bouvery et Rodolakis (2005) ont rapporté que le TFC est moins sensible que l'ELISA et qu'il échoue parfois à détecter les anticorps chez certains animaux. En plus, une infection récente est très difficilement diagnostiquée par le TFC car les anticorps peuvent persister longtemps après la maladie, sauf si les animaux avec des titres en TFC < 40 soient prélevés et testés à nouveau après trois semaines (Duquesnel, 1997).

En médecine humaine, le TFC est de plus en plus abandonné, et remplacé par l'immunofluorescence ou l'ELISA qui sont plus sensibles et plus rapides (Maurin et Raoult, 1999). Plusieurs études sont en faveur de l'utilisation de l'ELISA comme test plus sensible surtout pour le diagnostic de la forme aiguë de la fièvre Q (Field *et al.*, 1983 ; Williams *et al.*, 1986 ; Peter *et al.*, 1987 ; Peter *et al.*, 1988 ; Cowley *et al.*, 1992 ; Waag *et al.*, 1995 ; Khammassi-Khabou *et al.*, 2009). L'ELISA est incontestablement 10 fois plus performante que le TFC, mais la comparaison des deux tests en fonction des titres différents du TFC s'avère plus intéressante, puisque l'on rapporte que l'ELISA n'a pas la capacité de détecter la phase latente ou chronique de la maladie (Arricau-Bouvery et Rodolakis 2005). Dordain-Bouesnard (2001) a conclu que l'ELISA ne permettait pas de détecter les infectés latents avec des titres au TFC entre 10 et 40.

Les tests ELISA disponibles pour la fièvre Q sont plus sensibles que les tests de fixation du complément. Un troupeau entièrement séronégatif en ELISA devrait être indemne de fièvre Q. En revanche, un troupeau séropositif n'est pas forcément un troupeau qui excrète *C. burnetii*. La réponse anticorps persiste longtemps (au moins deux ans) même en l'absence de signes cliniques et d'excrétion (Berri *et al.*, 2002). Cependant, certaines femelles peuvent excréter pendant longtemps, dans le mucus vaginal ou le lait, en séronégatives (Rodolakis, 2006).

Dans cette étude, aucune différence significative n'a été retrouvée entre la prévalence de la fièvre Q et la taille du troupeau ($p > 0,05$), contrairement à l'étude de Yahiaoui *et al.* (2013) dans laquelle les troupeaux de grande taille sont plus infectés que les troupeaux de moyenne et de petite taille. La relation statistiquement significative entre la séropositivité vis-à-vis de *Coxiella burnetii* et la vaccination contre la clavelée ($p < 0,05$) et l'entérotoxémie ($p < 0,01$) pourrait être expliquée par le rôle des vétérinaires comme disséminateur de l'infection entre élevages via le matériel souillé, vêtements de travail, bottes, etc. En effet, 40,7 % des brebis testées étaient vaccinées contre la clavelée parmi lesquelles 60,7 % étaient séropositives à *Coxiella burnetii*.

La circulation d'oiseaux, de chats, de chiens et de rats dans la ferme constitue un facteur associé à l'infection par *Coxiella burnetii*. En effet, 60,7 % des brebis séropositives proviennent d'élevages où ces animaux sont présents. Meadows *et al.* (2012) ont révélé que l'achat d'animaux, l'usage de pièges pour rats, les animaux de remplacement ayant accès aux locaux d'agnelage, la non destruction des placentas ainsi que la présence d'élevages de petits ruminants à moins de 5 km constituaient des facteurs de risque de l'acquisition de la fièvre Q.

La fièvre Q est une zoonose qui circule de façon ubiquitaire. Son épidémiologie chez l'homme est mal connue. En Algérie, le premier cas de la fièvre Q humaine a été signalé en 1951 dans le nord-est du pays chez les fonctionnaires des abattoirs (Bernard *et al.*, 1963). Toutefois, quelques épisodes épidémiques humains ont été décrits dans les collectivités militaires à Batna et Oran par Pierrou et Moumoune en avril 1955 (Bernard *et al.*, 1963); ces auteurs ont signalé 175 cas sur 500 hommes ayant effectué un voyage dans des wagons qui ont servi au transfert de moutons. Dans une enquête parmi 500 donneurs de sang dans la région de Sousse en Tunisie, la prévalence de la fièvre Q était de 26 % et l'origine de l'infection a été nettement attribuée à des ovins et caprins (Letaief *et al.*, 1995).

Des sérologies positives contre *Salmonella abortus ovis* ont été notées en association à d'autres agents abortifs dans 5 troupeaux sur 39, soit une fréquence de 12,5 % des troupeaux, avec un taux de 8,4 % pour l'ensemble des brebis testées. Très peu d'études épidémiologiques

estimant la séroprévalence de la salmonellose abortive existent. Les résultats de cette étude sont supérieurs à ceux rapportés dans l'étude de Hamzy-El Idrissi *et al.* (1995) au Maroc (5 %) et ceux révélés en Suisse (1,7 %) (Wirz-Dittus *et al.*, 2010). Chartier et Chartier (1988) rapportent l'absence de la salmonellose abortive en Mauritanie.

L'infection vraie par *Salmonella abortus ovis* donne une réponse sérologique très durable avec l'obtention de titres élevés (Tadjebakhche *et al.*, 1971). Les réponses obtenues dans cette étude sont détectées par une technique mise au point chez les ovins, ce qui témoigne leur validité. Il est très probable qu'il s'agit ici d'une immunisation spécifique contre *Salmonella abortus ovis*. Les tests d'agglutination sont considérés comme méthode de choix dans le diagnostic des salmonelles (Davies *et al.*, 2004).

Concernant la **néosporose**, les anticorps anti-*Neospora caninum* sont en association chez 4 brebis sur 183 testées, soit un taux de 2,2 %. A l'échelle des troupeaux, la prévalence de la néosporose est de 5,1% (2/39) (salmonellose-chlamydirose-néosporose et fièvre Q-chlamydirose-brucellose-néosporose). Les prévalences de la néosporose rapportées dans les différentes études varient de 6,4 % à 16,8 % (Figliuolo *et al.*, 2004a ; Figliuolo *et al.*, 2004b ; Bártová *et al.*, 2009 ; Panadero *et al.*, 2010 ; Czopowicz *et al.*, 2011 ; Diakou *et al.*, 2013). Dans une étude récente, da Silva Andrade *et al.* (2012) rapportent une prévalence individuelle de 13,1 % et une prévalence troupeau de 49,2 % dans les élevages ovins brésiliens. Le rôle abortif de *N. caninum* a été démontré dans de nombreux pays par divers auteurs chez les bovins et les ovins. Si l'implication de *N. caninum* dans les avortements de bovins en Algérie a été démontrée par Ghalmi *et al.* (2011), aucune donnée n'est actuellement disponible chez les ovins.

Les résultats sérologiques concernant la **brucellose** montrent la présence de cette infection dans un seul troupeau (2,5 %) avec un taux de 0,4 % de l'ensemble des brebis testées. La prévalence à l'échelle individuelle est faible par rapport à celles obtenues par Benhabyles *et al.* (1992) en Algérie (2,18 %), par Benkirane *et al.* (1990) au Maroc (2 %) et par Chadli (1983) en Tunisie (2 %). La faible prévalence de la brucellose ovine dans les troupeaux testés souligne la rareté de l'infection dans la région étudiée. En revanche, Rahal *et al.* (2011) mentionnent une prévalence troupeau de 11 %.

Une réponse sérologique obtenue par le test du Rose Bengale peut être aussi due à une réaction croisée avec des bactéries du même genre (Muñoz *et al.*, 2005) ou avec des anticorps vaccinaux (Zundel *et al.*, 1992). Mais, il se peut que la seule réponse sérologique positive obtenue dans cette étude par le test de Rose Bengale soit plutôt due à une souche sauvage de

Brucella et non à une souche vaccinale puisque les brebis prélevées dans l'intervalle de l'étude n'étaient pas vaccinées. La vaccination du cheptel ovin de la wilaya de Constantine a été décidée à partir du mois d'avril 2014.

Le test du Rose Bengale est réputé d'avoir une sensibilité analytique élevée mais une spécificité moindre (Alton *et al.*, 1988). L'ELISA indirecte possède une spécificité plus élevée que le RBT (Nielsen, 2002). L'étude menée par Khammassi-Khabou *et al.* (2009) en Tunisie a montré que 14 élevages sur les 224 testés possèdent au moins un animal positif au test au rose Bengale.

Concernant **les associations** de plusieurs agents abortifs rencontrés à l'échelle troupeau, 17 sur 39 troupeaux ont présenté des sérologies positives pour 2, 3 et 4 agents abortifs. L'association chlamydieuse-fièvre Q est la plus fréquemment observée dans les élevages et chez les brebis. En effet, les analyses sérologiques dans les élevages confirment la présence de l'association chlamydieuse-fièvre Q dans 11 troupeaux (soit 64,7 %). A l'échelle individuelle, 71,4 % des brebis séropositives pour *Chlamydia* spp. sont positives pour *Coxiella burnetii*. Les résultats de cette étude sont à rapprocher de ceux obtenus par divers auteurs dans différents pays dans lesquels ces associations ont été décrites : une étude réalisée dans la région de Kasr Boukhari par Rahal *et al.* (2011) a révélé l'infection simultanée par au moins deux agents abortifs dont *Brucella melitensis*, *Chlamydia* spp. et *Coxiella burnetii*. De même, une enquête menée en Tunisie sur 55 troupeaux de petits ruminants a souligné une polyinfection par deux à cinq agents abortifs parmi lesquels *Brucella melitensis*, *Chlamydia* spp., *Coxiella burnetii*, *pestivirus* et *Salmonella abortus ovis* (Rekiki *et al.*, 2005). Au Maroc, les enquêtes sérologiques de Benkirane *et al.* (1990) et de Hamzy-El Idrissi *et al.* (1995) ont montré la présence des associations de 2 ou 3 agents abortifs aussi bien dans les élevages que chez les brebis. Durand (1977) constate que certains troupeaux peuvent présenter simultanément une sérologie positive pour la salmonellose, la chlamydieuse et la brucellose.

Dans un troupeau associant des sérologies positives pour deux ou trois infections, l'avortement ne serait dû qu'à une seule maladie abortive qui peut agir seule ou parfois en association avec une cause non infectieuse (Chartier et Chartier, 1988). La prédominance de telle ou telle pathologie dépend du mode d'élevage entrepris dans l'exploitation (Hamzy-El Idrissi *et al.*, 1995). Toutefois, la primo-infection de la femelle en gestation risque de mener à la transmission de l'infection in utéro et donc à son entretien au sein de l'élevage (Rodolakis, 1994 ; Rodolakis, 2000).

Rousset *et al.* (2000) notent la possibilité d'infection mixte chez les ovins par *Chlamydia* et *Coxiella*. Lukacova *et al.* (1999) proposent la possibilité de réaction croisée entre *Chlamydia* et *Coxiella* qui se multiplient toutes deux dans le cytoplasme de cellules eucaryotes (Rodolakis, 1994). Une autre possibilité pourrait être l'existence d'une sensibilité accrue de certains individus aux deux bactéries à la fois. Cette sensibilité peut être due aux bactéries elles mêmes par une interaction positive sur le système immunitaire, les unes facilitent l'accès aux autres ou les unes favorisent une forte réponse immunitaire vis-à-vis des autres (Lenoble, 2002).

L'intervention de facteurs d'exposition surtout pendant les périodes de mise bas peuvent provoquer la dissémination de plusieurs agents abortifs notamment *Chlamydia* et *Coxiella* (Lenoble, 2002).

7. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence des anticorps dirigés contre les agents de la chlamydie, la fièvre Q, la salmonellose abortive ovine, la néosporose et la brucellose, ce qui témoigne une évidence sérologique de la présence de ces agents dans les élevages de la wilaya de Constantine. Les résultats obtenus montrent :

- Une prédominance de la chlamydie (45,5 %) et de la fièvre Q (12,4 %) à l'échelle individuelle. A l'échelle troupeau, les taux de séropositivité de ces maladies sont de 84,6 % pour la chlamydie et de 35,9 % pour la fièvre Q.
- L'apparition de nouvelles infections comme la salmonellose abortive ovine et la néosporose (présence des anticorps d'anticorps anti-*Neospora caninum* et anti-*Salmonella abortus ovis* en association avec d'autres agents abortifs) dans les élevages ovins.
- Un faible taux de brucellose (0,4 %).
- La prédominance de l'association chlamydie-fièvre Q.

Cette étude a souligné une poly-infection des troupeaux étudiés qui ne possèdent pas le même statut immunitaire vis-à-vis des agents abortifs recherchés. Ainsi, le mélange des animaux de sources différentes constitue une prise de risque. L'étude des facteurs de risque contribuant à l'introduction et à la dissémination des agents abortifs notamment de la chlamydie ; prend alors toute son importance.

Afin de confirmer l'implication de ces germes dans les avortements, il serait intéressant de compléter cette enquête par le dépistage des ces maladies sur des brebis ayant avorté et surtout rechercher l'agent pathogène au niveau du placenta et de l'avorton.

Chapitre II.

*Séroprévalence et facteurs de risque associés
à l'infection par Chlamydia spp. chez les
brebis dans la wilaya de Constantine*

Chapitre II

Séroprévalence et facteurs de risque associés à l'infection par *Chlamydia* spp. chez les brebis dans la wilaya de Constantine

1. Introduction

Les chlamydies sont des bactéries à gram négatif et à multiplication intracellulaire obligatoire qui sont responsables de pathologies diverses chez un large éventail d'hôtes, y compris les amibes, les invertébrés, les poissons, les reptiles, les mammifères et les oiseaux. Selon la nouvelle classification, la famille des *Chlamydiaceae* regroupe un seul genre et neuf espèces (Wheelhouse et Longbottom, 2012). Chez les ruminants, deux espèces ont été décrites : *C. abortus* responsable d'avortement enzootique et d'hypofertilité et *C. pecorum* à l'origine d'infections intestinales asymptomatiques, pneumonies, conjonctivites, encéphalomyélites, polyarthrites et épидидymites (Everett, 2000).

Les infections subcliniques par *Chlamydia* spp. se soldent par de lourdes pertes économiques en élevage ovin et sont occasionnées surtout par les cas d'infertilité et de résorption fœtale (Papp *et al.*, 1993). En effet, les chlamydies peuvent coloniser le placenta et causer des avortements spontanés, des mortinatalités ou des mortalités périnatales (Buxton *et al.*, 1990 ; Longbottom et Coulter, 2003). Par ailleurs, ces bactéries sont à l'origine d'infections génito-urinaires, mammites, diarrhées et hépatites. *C. abortus*, agent de l'avortement enzootique ovin demeure la cause la plus importante d'avortement chez les brebis dans plusieurs pays (Rodolakis et Yousef Mohamad, 2010). Cependant, certaines souches de *C. pecorum* ont été isolées à partir de cas d'avortement ovins, en particulier au Maroc et en Tunisie (Rekiki, 2004 ; Berri *et al.*, 2009). L'importance des *Chlamydia* spp. tient aussi au fait qu'elles sont transmissibles à l'homme, particulièrement aux femmes enceintes en contact avec des brebis ayant avorté ou lors d'agnelage. En effet, les chlamydies causent une placentite suivi d'avortement (Hadley *et al.*, 1992; Pospischil *et al.*, 2002; Walder *et al.*, 2005). L'étude de l'épidémiologie de la chlamydiose prend alors toute sa place surtout qu'il existe peu de données nationales sur cette infection.

2. Objectifs de l'étude

Dans le but de contribuer à l'étude de la situation épidémiologique des infections à *Chlamydia* spp. chez les brebis, il a été choisi d'entreprendre une étude sérologique transversale. Celle-ci vise les objectifs spécifiques suivants :

- Estimer la séroprévalence de l'infection par *Chlamydia* spp. chez les brebis dans les 12 communes de la wilaya de Constantine,
- Déterminer les facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de *Chlamydia* spp.

3. Matériel et méthodes

3.1. Animaux

Cette étude porte sur 552 sérums de brebis âgées entre 12 et 59 mois et issus de 54 élevages ovins, répartis sur les 12 communes de la wilaya de Constantine.

Les données relatives à la conception de l'étude, aux méthodes de collecte des données épidémiologiques et des prélèvements de sang sont décrites dans le chapitre « dépistage sérologique des infections abortives chez les brebis dans la wilaya de Constantine : chlamydie, fièvre Q, brucellose, salmonellose et néosporose ».

3.2. Méthode sérologique

La recherche des anticorps dirigés contre *Chlamydia* spp. a été effectuée par une technique immunoenzymatique de type ELISA indirecte en utilisant le kit LSIVET Ruminant Serum Chlamydiosis, France. Le test a été réalisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. Les sérums de contrôle positif et négatif à *Chlamydia* spp. étaient fournis avec le kit. Cependant, le kit est incapable de distinguer les anticorps anti-*C. abortus* de ceux dirigés contre *C. pecorum*.

Ainsi, 5 µl des échantillons et contrôles ont été déposés dans la plaque sensibilisée avec de l'antigène *Chlamydia*. Les anticorps spécifiques éventuellement présents se lient à l'antigène. Le mode opératoire, calcul et interprétation des résultats sont détaillés en annexe 2.

La lecture des résultats (densité optique) s'est réalisée par un lecteur de plaques ELISA (Biotek, Elx800) à 450 nm en monochromatisme (figure 17). Le traitement des résultats était facilité par l'usage du logiciel Gen5™ (figure 18). Les analyses sérologiques ont été effectuées au niveau du laboratoire de Biotechnologie de la Reproduction, NCARE (National Center for Agricultural Research and Extension), Amman, Jordanie.



Figure 17 : Lecture des résultats (densité optique) par un lecteur de plaques ELISA (Biotek, Elx800) à 450 nm

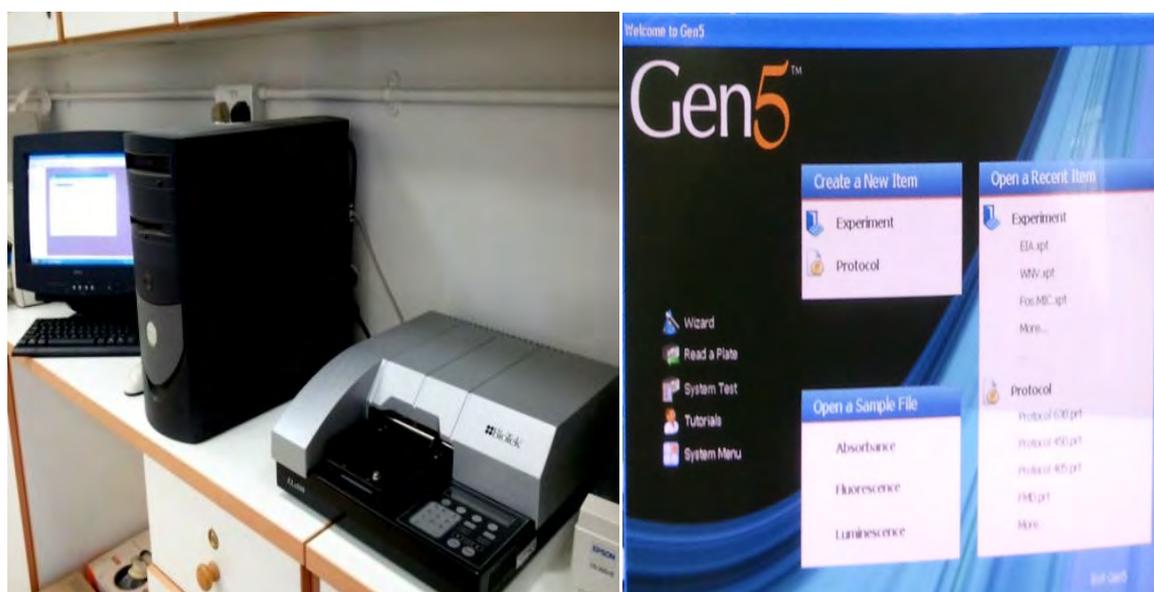


Figure 18 : Traitement des résultats sérologiques par le logiciel Gen5™

3.3. Analyses statistiques

L'exploitation statistique des données recueillies à partir du questionnaire et des résultats de l'analyse sérologique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS version 20 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

L'étude des facteurs de risque potentiels d'infection par *Chlamydia* spp. a été effectuée en deux étapes. L'association significative entre les variables explicatives et la séropositivité vis-à-vis de *Chlamydia* spp. a été initialement recherchée par le test du Khi-deux de Pearson (χ^2). Ensuite, les variables présentant une significativité statistique modérée ($p \leq 0,25$) dans l'analyse univariée et avec un nombre ≥ 5 dans chaque cellule, ont été incluses dans un modèle multivarié de régression logistique. La variable « troupeau » a été ajoutée dans le modèle comme facteur à effet fixe. Le modèle a été développé selon une approche pas à pas descendant, utilisant à chaque étape un test de rapport de vraisemblance avec 0,1 comme seuil de significativité pour l'entrée ou le retrait des variables. La significativité statistique des facteurs de risque étudiés dans le modèle final est retenue lorsque la valeur de p est inférieure à 5 % (Abu-dalbouh *et al.*, 2012). La validation du modèle a été évaluée par le test d'adéquation d'Hosmer et Lemeshow (Hosmer et Lemeshow, 1989).

Les corrélations entre les variables indépendantes et la séropositivité ont été calculées par le rapport des cotes (OR). Les odd ratio (OR) sont indiqués avec des intervalles de confiance (IC) de 95 %. Une variable est un facteur de risque lorsque l'odd ratio est supérieur à 1 et lorsque la valeur de p est inférieure à 0,05.

4. Résultats

4.1. Taux de séroprévalence de *Chlamydia* spp.

Sur les 552 sérums testés, 135 échantillons sont *Chlamydia* spp. séropositifs soit un taux de séroprévalence individuelle de 24,5 %. Par ailleurs, 417 (75,5 %) échantillons sont séronégatifs.

A l'échelle troupeau, parmi les 54 cheptels étudiés, 38 (70,4 %) possèdent au moins une brebis séropositive.

Les résultats obtenus démontrent une différence très significative entre la prévalence des anticorps anti-*Chlamydia* et la localisation géographique des brebis testées ($p < 0,01$). Les taux de séropositivité les plus élevés sont notés au sud de la wilaya de Constantine plus précisément dans les communes d'Ain Abid (38,6 %) et Ain Smara (36 %), suivi des communes d'El Khroub (32,1%) et de Ouled Rahmoune (30,6 %). Toutefois, le taux de prévalence le plus bas (5 %) a été observé dans la commune de Messaoud Boudjriou (5 %), au nord de Constantine (tableau 13).

Tableau 13 : Distribution des brebis séropositives et séronégatives à *Chlamydia* spp. dans les 12 communes de la wilaya de Constantine

Commune	Nombre testé	Séropositives (No)	Séronégatives (No)	Séropositives (%)
Ain Abid	57	22	35	38,6
Ain Smara	25	9	16	36
Béni Hmidane	60	10	50	16,7
Constantine	39	6	33	15,4
Didouche Mourad	17	2	15	11,8
Hamma Bouziane	22	4	18	18,2
Ibn Badis	28	3	25	10,7
Ibn Ziad	80	15	65	18,8
El Khroub	109	35	74	32,1
Messaoud Boudjriou	20	1	19	5
Ouled Rahmoune	62	19	43	30,6
Zighoud Youcef	33	9	24	27,3

$\chi^2 = 26,88$, valeur $p = 0,005$

Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été retrouvée entre la séropositivité vis-à-vis de *Chlamydia* spp. et la taille du troupeau (tableau 14). Tout de même, la séropositivité augmente proportionnellement avec l'augmentation de la taille du troupeau. En effet, le taux de séroprévalence le plus élevé (29,6 %) a été observé dans le groupe de troupeaux possédant un effectif de plus de 300 têtes d'ovins tandis que le taux le plus faible (20,7 %) a été noté dans le groupe dénombrant entre 10 et 99 têtes d'ovins.

Tableau 14 : Distribution des brebis séropositives et séronégatives à *Chlamydia* spp. en fonction de la taille des troupeaux

Taille du troupeau (têtes)	Troupeaux No	Brebis testées No	Séropositives No (%)	Séronégatives No (%)
Petite (10-99)	25	208	43 (20,7)	165 (79,3)
Moyenne (100-300)	14	138	31 (22,5)	107 (78,1)
Grande (> 300)	15	206	61 (29,6)	145 (70,1)
Total	54	552	135	417

$$\chi^2 = 4,871 ; \text{valeur } p = 0,088$$

Le tableau 15 présente les résultats de l'analyse univariée de l'association entre la séropositivité vis-à-vis de *Chlamydia* spp. et les différents facteurs étudiés.

Une différence significative ($p < 0,05$) a été retrouvée entre la séropositivité vis-à-vis de *Chlamydia* spp. et les différentes classes d'âge. Il a été noté que la prévalence augmente avec l'âge. Celle-ci est de 7,5% et 33,3 % chez les brebis âgées de 12 à 23 mois et de 48 à 59 mois respectivement (tableau 15).

Une corrélation significative a été notée entre l'infection par *Chlamydia* spp. et les facteurs suivants : visiteurs de la ferme, circulation d'animaux domestiques et nuisibles dans la ferme ($p < 0,05$). La même constatation a été notée pour les facteurs : naissance d'agneaux chétifs et mortalités ($p < 0,001$). D'autre part, l'analyse univariée a révélé une différence significative ($p < 0,05$) entre la séropositivité vis-à-vis de *Chlamydia* spp. et les facteurs : septicémie chez les agneaux, infécondité ($p < 0,05$).

En revanche, une différence non significative a été observée entre la prévalence des anticorps anti-*Chlamydia* spp. et les facteurs suivants : stade d'avortement, usage de désinfectants et le taux de mortalité chez les agneaux.

Bien qu'aucune différence significative n'ait été retrouvée entre la présence d'anticorps et les antécédents d'avortement, il a été noté que parmi les 372 brebis ayant un antécédent d'avortement, 100 (26,9 %) possèdent des anticorps sériques spécifiques à *Chlamydia* spp. ($p > 0,05$).

Tableau 15 : Distribution des brebis séropositives et séronégatives à *Chlamydia* spp. en fonction des différents facteurs testés dans l'analyse univariée par le test du Khi-deux de Pearson

Variable	Catégorie	Nombre	<i>Chlamydia</i> spp.		p
			N°+ve (%)	N°-ve (%)	
Age (mois)	12 – 23	53	4 (7.5)	49 (92.5)	0.014
	24 – 35	214	53 (24.8)	161 (75.2)	
	36 – 47	240	63 (26.3)	177 (73.8)	
	48 – 59	45	15 (33.3)	30 (66.7)	
Avortement	Oui	372	100 (26.9)	272 (73.1)	0.058
	Non	180	35 (19.4)	145 (80.6)	
Traitement des animaux achetés	Oui	398	110 (27.6)	288 (72.4)	0.006
	Non	154	25 (16.2)	129 (83.8)	
Visiteurs de la ferme	Ouvriers de fermes voisines	28	13 (46.4)	15 (53.6)	0.012
	Vétérinaires	362	89 (24.6)	273 (75.4)	
	Tous	162	33 (20.4)	129 (79.6)	
Fréquence de désinfection	1 fois/mois	56	22 (39.3)	34 (60.7)	0.026
	Semestriel	17	2 (11.8)	15 (88.2)	
	1 fois/an	186	47 (25.3)	139 (74.7)	
	Néant	293	64 (21.8)	229 (78.2)	
Préparation de l'aliment dans la ferme	Oui	175	57 (32.6)	118 (67.4)	0.003
	Non	377	78 (20.7)	299 (79.3)	
Mortinatalités	Oui	332	102 (30.7)	230 (69.3)	0.000
	Non	220	33 (15)	187 (85)	
Mise bas d'agneaux chétifs	Oui	358	106 (29.6)	252 (70.4)	0.000
	Non	194	29 (14.9)	165 (85.1)	

Septicémie chez les agneaux	Oui	32	14 (43.8)	18 (56.3)	0.018
	Non	520	121 (23.3)	399 (76.7)	
Taux de mortalité chez les jeunes agneaux	<5%	372	83 (22.3)	289 (77.7)	0.110
	5 – 10%	129	34 (26.4)	95 (73.6)	
	10 – 20%	51	18 (35.3)	33 (64.7)	
Infécondité	Oui	75	27 (36)	48 (64)	0.020
	Non	477	108 (22.6)	369 (77.4)	
Type de désinfectant utilisé	Chaux	227	57 (25.1)	170 (74.9)	0.023
	Biocide	32	14 (43.8)	18 (56.3)	
	Néant	293	64 (21.8)	229 (78.2)	
Circulation d'animaux domestiques et nuisibles dans la ferme	Chats	84	13 (15.5)	71 (84.5)	0.016
	Rats	25	2 (8)	23 (92)	
	Oiseaux	38	6 (15.8)	32 (84.2)	
	Chiens	14	3 (21.4)	11 (78.6)	
	Toutes espèces citées	391	111 (28.4)	280 (71.6)	
Stade d'avortement	2 ^{ème} stade	21	7 (33.3)	14 (66.7)	0.167
	3 ^{ème} stade	385	100 (26)	285 (74)	
	Néant	146	28 (19.2)	118 (80.8)	
Usage de désinfectants	Oui	259	71 (27.4)	188 (72.6)	0.163
	Non	293	64 (21.8)	229 (78.2)	

4.2. Les facteurs de risque associés à l'infection par *Chlamydia* spp. chez les brebis dans la wilaya de Constantine

En somme, 17 variables ont vu leur valeur p inférieure à 0,25 dans l'analyse univariée. Celles-ci ont été considérées pour l'analyse multivariée. Ainsi, le modèle final de régression logistique a défini cinq variables significativement associées à l'infection par *Chlamydia* spp. :

En premier lieu, la catégorie d'âge comprise entre 12 et 23 mois (OR = 5,903 ; IC à 95% (OR)= 1,690–20,618). En second lieu, le non usage de désinfectants (OR = 2,099 ; IC à 95% (OR) = 1,314–8,065). Les cas de mortinatalité (OR = 3,682 ; IC à 95% (OR) = 1,825–7,430) et un taux de mortalité de 5 à 10 % chez les jeunes agneaux (OR = 2,584 ; IC à 95% (OR)= 1,058–6,310) étaient significativement corrélés à la présence d'anticorps anti-*Chlamydia* spp. chez les brebis testées (tableau 16). Cependant, le modèle a défini la disponibilité des services vétérinaires comme facteur protecteur contre l'infection chlamydienne (OR= 0,161 ; IC à 95%(OR) = 0,051–0,511) (tableau 16).

Tableau 16 : Analyse multivariée par régression logistique des facteurs associés à la séropositivité vis-à-vis de *Chlamydia* spp.

Variables		B ^a	ES ^b	OR ^c	95% IC ^d (OR)	Valeur
Constante		-1.927	0.860	-	-	0.025
Troupeau		0.345	0.240	1.412	0.882 ; 2.261	0.150
Age (mois)	12 – 23	1.775	0.638	5.903	1.690 ; 20.618	0.005
Services vétérinaires		-1.829	0.590	0.161	0.051 ; 0.511	0.002
Non usage de désinfectants		1.180	0.463	2.099	1.314 ; 8.065	0.011
Mortinatalités		1.303	0.358	3.682	1.825 ; 7.430	0.000
Mortalités chez les jeunes agneaux	5 – 10%	0.949	0.455	2.584	1.058 ; 6.310	0.037

Model Khi-deux 53.63 avec degrés de liberté ddl = 16.

Model -2 log-vraisemblance (rapport de vraisemblance) 254.693.

Qualité de l'ajustement de Hosmer-Lemeshow du Khi-deux de Pearson= 84.922, valeur p = 0.251.

^a Coefficient de régression logistique Beta non standardisé.

^b Erreur standard.

^c Odds ratio.

^d Intervalle de confiance.

5. Discussion

A notre connaissance, cette enquête épidémiologique est la première étude en Algérie élucidant les facteurs de risque associés à la prévalence des anticorps sériques dirigés contre *Chlamydia spp.* chez un nombre représentatif de brebis sélectionnées aléatoirement.

La présente étude est de type transversal. Il s'agit d'une étude observationnelle qui a de nombreux avantages par rapport à d'autres types d'études dont la collecte de données peut s'étaler sur une longue période. Elle est plus facile à effectuer, demande peu de temps et elle est moins coûteuse.

Puisque la vaccination contre la chlamydie des ruminants n'est pas pratiquée en Algérie, les résultats de cette enquête sérologique reflètent certainement une réponse naturelle à l'infection. Les sérums ont été testés à l'aide d'un kit ELISA indirecte qui détecte spécifiquement les anticorps anti-*C. abortus* et anti-*C. pecorum* mais ne permet pas de les distinguer. Du moins, la recherche des anticorps dirigés contre ces deux agents pathogènes demeure essentielle car ils ont été tous deux incriminés dans de nombreuses pathologies chez les ovins (Papp *et al.*, 1993).

Dans la présente recherche, 135 sur 552 brebis sont séropositives soit un taux de prévalence individuelle de 24,5 %. Plusieurs études ont été réalisées dans de nombreux pays afin d'estimer la séroprévalence de l'infection chlamydienne chez les ovins. Les résultats de la présente étude sont supérieurs à ceux rapportés par Al-Qudah *et al.* (2004) au nord de la Jordanie et par Gokce *et al.* (2007) en Turquie où des taux de prévalence de 21,8 % et 13,9 % ont été respectivement notés.

A travers cette étude, 70,4 % des troupeaux renferment au moins une brebis séropositive à *Chlamydia spp.* Ces résultats sont proches de ceux rapportés par Bostedt et Dedie (1996) en Allemagne (70 %) et Pinheiro J *et al.* (2010) dans l'état brésilien d'Alagoas (77,7 %).

En revanche, les résultats de cette étude sont inférieurs à ceux notés dans la région de Torrelaguna en Espagne, où une prévalence de troupeau de 96,5 % et une prévalence individuelle de 50,5 % ont été rapportées (Mainar-Jaime *et al.*, 1998).

Des études sérologiques ont été mises en œuvre dans les pays du Maghreb afin de connaître la situation épidémiologique de la chlamydie en utilisant une méthodologie d'analyse par technique ELISA ou par fixation du complément. Dans la majorité de ces enquêtes, la population cible est constituée par des ovins ayant eu des antécédents d'avortement, de mortinatalité ou des problèmes de reproduction. La séroprévalence de l'infection à *Chlamydia* spp. dans cette étude est supérieure à celle estimée au Maroc (15,8 %) par Hamzy-El Idrissi *et al.* (1995) et en Tunisie (6,25 %) par Zaibet *et al.* (2009).

L'étude des facteurs de risque liés à l'infection chlamydienne a révélé une différence significative ($p < 0,01$) entre la localisation géographique des brebis et la prévalence des anticorps anti-*Chlamydia* spp. En effet, les taux de séropositivité les plus élevés sont retrouvés au sud de la wilaya. Ceci peut être expliqué par de nombreux facteurs : la densité de la population ovine, la taille des troupeaux, les pratiques d'élevage et le mouvement des animaux (Houe *et al.*, 1995). La densité de la population ovine et l'effectif des troupeaux sont plus importants dans les communes de Ain Abid, Ain Smara et El Khroub. Par ailleurs, le risque d'infection augmente avec l'intensité et la fréquence de contact avec les sources d'infection potentielles dans les troupeaux ovins à grands effectifs.

Les anticorps dirigés contre *Chlamydia* spp. ont été retrouvés dans toutes les catégories d'âge. Cependant, la prévalence de l'infection augmente proportionnellement avec l'âge. En effet, les taux de séropositivité sont 4,4 fois plus élevés chez les brebis âgées entre 48 et 59 mois que ceux âgées entre 12 et 23 mois ($p < 0,05$). Selon l'étude d'Al-Qudah *et al.* (2004), la relation entre la prévalence de l'infection et l'âge des brebis ne revêt pas de signification statistique. Ce sont les animaux en âge de se reproduire qui représentent un niveau de réaction immunitaire contre la chlamydie beaucoup plus élevé. En plus, il y a un cumul des réactions immunitaires avec l'âge. L'augmentation de la prévalence des anticorps vis-à-vis de la chlamydie chez les sujets plus âgés est le résultat du risque cumulatif. En effet, les animaux âgés accumulent les facteurs prédisposant à l'infection en raison d'une exposition à long terme à l'infection, du plus grand nombre de sources d'infection et d'une plus grande fréquence d'occurrence de l'infection (Teshale *et al.*, 2007 ; Carneiro *et al.*, 2009).

La variable « troupeau » a été incluse dans le modèle de régression logistique comme variable à effet fixe. Ainsi, toutes les variables du modèle de régression logistique ont été ajustées pour la variable troupeau. En d'autres termes, nous avons supprimé l'effet du troupeau sur d'autres variables dans le modèle final.

L'analyse de régression logistique a révélé la catégorie d'âge entre 12 et 23 mois comme facteur de risque. Ceci peut être expliqué par le fait que les animaux porteurs d'infection sont souvent infectés pendant la gestation ou aussitôt après l'agnelage (Bagdonas *et al.*, 2007). En effet, les brebis excrètent *C. abortus* jusqu'à deux semaines après l'avortement et que les corps élémentaires de la bactérie restent infectieux plusieurs semaines après, ce qui augmente le risque de dissémination de l'infection. Ce résultat est en accord avec l'étude de Bagdonas *et al.* (2007) où les taux de séropositivité les plus élevés ont été retrouvés dans la tranche d'âge entre 18 et 24 mois ($p < 0,01$).

Le modèle final de régression logistique multivariée a révélé que le risque de posséder des anticorps anti-*Chlamydia* est 3,6 fois plus élevé pour les brebis ayant eu des antécédents de mortinatalités. La survenue de mortinatalités ne doit pas être considérée comme facteur de risque mais plutôt une conséquence d'infection par *Chlamydia* spp. De plus, le risque relatif est 2,5 fois plus élevé dans les troupeaux enregistrant des taux de mortalité de 5 à 10 % chez les jeunes agneaux. En effet, l'infection par *C. abortus* des brebis gestantes provoque soit l'avortement, la mortinatalité ou la mise bas d'agneaux faibles et difficiles à élever qui sont susceptibles de contracter rapidement des maladies (Rodolakis et Yousef Mohamad, 2010). Chalmers *et al.* (1997) ont constaté que 78 % des agneaux issus de brebis infectées expérimentalement sont expulsés soit avortés ou mort-nés, tandis que 22 % naissent vivants mais infectés inapparents.

Dans cette étude le non usage de désinfectants augmente d'autant le risque de développer une infection chlamyidienne ($p < 0,05$). Au contraire, la disponibilité des services vétérinaires a été définie comme facteur protecteur contre l'infection ($p < 0,01$). *Chlamydia* spp. sont sensibles à la plupart des désinfectants et détergents, ainsi qu'à la chaleur (Longbottom et Coulter, 2003). Une dilution de 1 pour 1000 de composés d'ammonium quaternaire, 70 % d'alcool isopropylique, 1 % Lysol, 1:100 de dilution d'eau de Javel ou des chlorophénols sont tous efficaces (Longbottom et Coulter, 2003). Le traitement des brebis gestantes à base d'oxytétracycline à action prolongée (LA) à la dose de 20 mg/kg de poids vif et par voie intramusculaire 6 semaines puis 3 semaines avant la date présumée de mise bas réduit la gravité de l'infection, atténue la placentite chez les brebis infectées et juggle l'extension de l'agent pathogène dans le troupeau. Bien que ce type de traitement contribue à diminuer le nombre d'avortements, il n'élimine pas l'infection. En effet, la mise à terme d'agneaux mort-nés ou chétifs peut se produire (Stuen et Longbottom, 2011). De plus, ce traitement n'est pas économiquement rentable.

6. Conclusion

Cette enquête sérologique transversale a permis d'élucider en partie l'épidémiologie de la chlamydie ovine chez les brebis de la wilaya de Constantine, au nord-est de l'Algérie.

En définitive, ce chapitre transmet les connaissances et dresse le portrait sanitaire des troupeaux ovins de Constantine vis-à-vis de l'infection par *Chlamydia spp.*

Les informations obtenues par l'intermédiaire de cette enquête permettent de constater que l'infection par cet agent abortif est largement répandue. La prévalence individuelle a été estimée à 24,5 %. La présence des anticorps anti-*Chlamydia spp.* dans les sérums testés est une évidence sérologique de la présence de cet agent pathogène dans la plupart des troupeaux enquêtés. En effet, 70,4 % des troupeaux possèdent au moins une brebis séropositive.

Des mesures de lutte appropriées contre l'infection consistent d'abord à éliminer les facteurs de risque et renforcer les mesures de biosécurité dans les élevages. En résumé, les facteurs de risque d'acquisition d'une infection à *Chlamydia spp.* définis par la présente étude sont le jeune âge (12 à 23 mois) et le non usage des désinfectants.

L'étude a démontré une corrélation significative entre l'infection chlamydienne et la survenue de mortinatalités et de mortalités chez les jeunes agneaux. La disponibilité des services vétérinaires a été définie comme facteur protecteur contre l'infection.

Ces résultats méritent d'être consolidés en menant des recherches approfondies dans le sens de distinction entre les infections à *C. abortus* de celles causées par *C. pecorum* à l'aide de tests diagnostiques adaptés, rapides et fiables en l'occurrence les tests ELISA spécifiques à *C. abortus* et la caractérisation moléculaire des souches isolées à partir d'avortons et de placentas ovins.

Cette étude épidémiologique devrait être généralisée pour toute l'Algérie afin de pouvoir renseigner sur l'importance de ces infections et d'implanter un système de surveillance et de contrôle efficace.

Chapitre III.

*L'avortement enzootique des brebis :
Prévalence et facteurs de risque associés à
l'infection des brebis par C. abortus dans la
wilaya de Constantine*

Chapitre III

L'avortement enzootique des brebis : Prévalence et facteurs de risque associés à l'infection des brebis par *Chlamydia abortus* dans la wilaya de Constantine

1. Introduction

Chlamydia abortus (*C. abortus*) est une cause majeure de perte d'agneaux et d'avortements tardifs chez les petits ruminants dans de nombreux pays à travers le monde (Smith et Sherman, 1994 ; Aitken, 2000 ; Szeredi et Bacsadi, 2002 ; Longbottom et Coulter, 2003; Aitken et Longbottom, 2007).

Une transmission verticale de *C. abortus* peut se produire par la mise bas d'agneaux vivants et infectés inapparents. Ces agneaux peuvent excréter les chlamydies à leur tour, contribuant ainsi à la pérennisation de l'infection dans le troupeau. Les agnelles infectées quand à elles avortent à leur première saison de mise bas (Milne *et al.*, 2009).

Il existe très peu de données nationales sur la situation épidémiologique et les facteurs de risque liés à l'avortement enzootique des brebis. Le diagnostic sérologique par fixation du complément (TFC) demeure difficile à standardiser et à mettre en œuvre. En plus, le TFC présente des réactions croisées entre *C. abortus* et *C. pecorum* du fait qu'elles possèdent tous deux un lipopolysaccharide commun.

La technique ELISA utilisé dans la présente étude est basée sur l'utilisation d'un antigène recombinant, une protéine spécifique de *C. abortus* et ne présente pas de réaction croisée avec *C. pecorum*.

2. Objectifs de l'étude

Cette étude vise les objectifs suivants :

- Estimer la prévalence de l'avortement enzootique des brebis dans la wilaya de Constantine,
- Déterminer les facteurs de risque associés à l'infection par *C. abortus*.

3. Matériel et méthodes

3.1. Animaux

Cette étude porte sur les 552 sérums de brebis issues des 54 élevages ayant fait l'objet de l'étude décrite dans le chapitre II.

3.2. Analyse sérologique

L'analyse des sérums a été réalisée par technique immunoenzymatique de type ELISA indirecte, en utilisant le kit ID-Screen *Chlamydophila abortus* Indirect Multi-species (Pourquier, France). Contrairement au kit utilisé dans l'étude précédente, ce kit est capable de détecter spécifiquement les anticorps dirigés contre *C. abortus*. En d'autres termes, il n'existe pas de réactions croisées avec *C. pecorum*. La sensibilité et spécificité du test sont de l'ordre de 100 %. Les témoins positif et négatif aux anticorps anti-*C. abortus* étaient fournis avec le kit. Tous les réactifs du kit ont été ramenés à température ambiante puis homogénéisés par retournement avant leur emploi. La solution de lavage (1X) a été préparée par dilution au 1/20^{ème} de la solution de lavage (20X) dans de l'eau distillée. Le test ELISA a été réalisé selon le mode opératoire suivant :

- Pour réduire la différence des temps d'incubation entre les échantillons, une microplaque de 96 puits contenant les échantillons à tester et les échantillons de contrôle a été préparée. Les échantillons ont été ensuite transférés dans la plaque ELISA avec une pipette multicanaux :
 - 10 µl de contrôle négatif dans les cupules A1 et B1 ;
 - 10 µl de contrôle positif dans les cupules C1 et D1 ;
 - 10 µl de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes.
- 90 µl de tampon de dilution 13 ont été distribués dans chaque puits.
- La plaque a été incubée pendant 45 min ± 4 min à 21°C (± 5°C).
- Les puits ont été vidés puis chaque cupule a été lavée 3 fois avec environ 300 µl de Solution de lavage tout en évitant le dessèchement des cupules entre les lavages.
- Le Conjugué 1X a été préparé en diluant le Conjugué 10x au 1/10^{ème} en Tampon de dilution 3.
- 100 µl de Conjugué 1X ont été distribués dans chaque cupule.
- La plaque a été incubée pendant 30 min ± 3 min à 21°C (±5°C).
- Les puits ont été vidés puis chaque cupule a été lavée 3 fois avec environ 300 µl de Solution de lavage.
- 100 µl de la solution de révélation ont été distribués dans chaque cupule.

- La plaque a été incubée pendant 15 min ± 2 min à 21°C (±5°C) à l'obscurité.
- 100 µl de Solution d'arrêt ont été distribués dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
- Les densités optiques ont été mesurées et enregistrées à 450 nm.

Pour chaque échantillon testé, le pourcentage S/P a été calculé selon la formule suivante:

$$S/P = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{CP}} \times 100$$

Les échantillons présentant un S/P:

- Inférieur ou égal à 50% sont considérés comme négatifs ;
- Compris entre 50% et 60% sont considérés comme douteux ;
- Supérieur ou égal à 60% sont considérés comme positifs.

Le principe du test, la composition du kit, le mode opératoire, le calcul ainsi que l'interprétation des résultats sont détaillés en annexe 5.



Figure 19 : Composition du kit ELISA ID-Screen *Chlamydomphila abortus* Indirect Multi-species



Figure 20 : Distribution de 100 µl de la solution d'arrêt dans chaque puits avant la lecture des résultats

3.3. Analyse statistique

L'exploitation statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS version 20 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Les analyses statistiques réalisées sont semblables à celle décrites dans le chapitre précédent. En résumé, la corrélation entre les facteurs de risque potentiels et la séropositivité vis-à-vis de *C. abortus* a été étudiée par l'intermédiaire du test du Khi-deux et de la régression logistique multinominale. Une valeur de p inférieure à 5 % est considérée comme seuil de significativité statistique.

4. Résultats

4.1. Séroprévalence de l'avortement enzootique des brebis

Parmi les 552 sérums testés, 40 sont positifs vis-à-vis de *C. abortus* soit un taux de séroprévalence individuelle de 7,2 %. Par contre, 512 échantillons (92,8 %) sont séronégatifs. A l'échelle troupeau, 18 élevages contiennent au moins une brebis séropositive soit une prévalence de troupeau de 33,3 %.

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre la séroprévalence de *C. abortus* et les différentes classes d'âge (χ^2 ; $P > 0.05$). Cependant, les taux de séropositivité diminuent avec l'âge. Les taux de séroprévalence les plus élevés sont observés chez les brebis âgées de 24 à 35 mois. L'absence des anticorps anti-*C. abortus* est notée chez les brebis âgées entre 12 et 23 mois (figure 21).

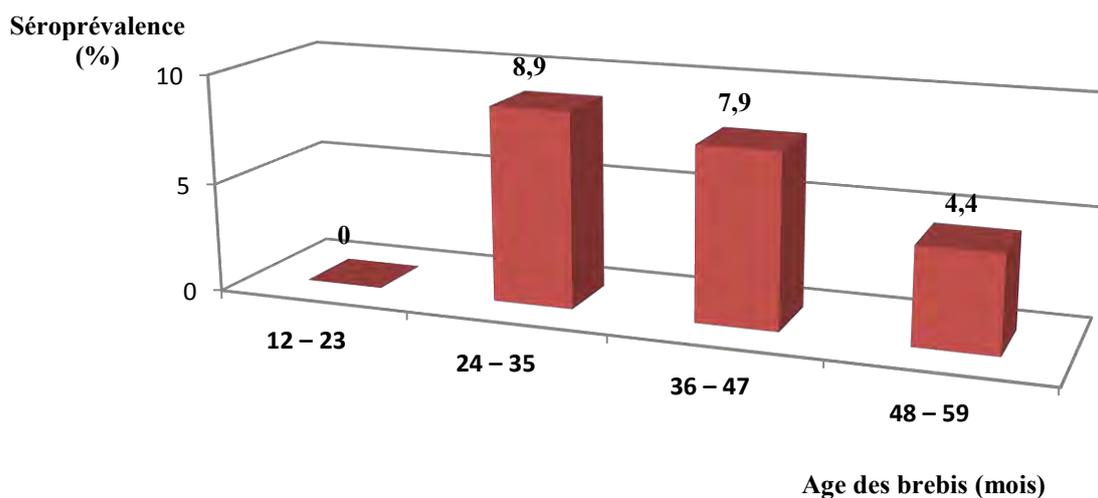


Figure 21 : Taux de séroprévalence de *Chlamydia abortus* chez les brebis en fonction de l'âge

Une corrélation hautement significative est observée entre la prévalence de l'infection et la localisation géographique. Les taux de séropositivité varient de 0 à 18,2 % dans les 12 communes de Constantine. La prévalence de l'infection est plus élevée dans les élevages situés au nord que ceux localisés au sud de la wilaya (χ^2 ; $p < 0.0001$). La prévalence de l'avortement enzootique des brebis est de 0 % dans les communes de Constantine, Hamma Bouziane, Didouche Mourad, Ibn Badis et Messaoud Boudjriou. En revanche, les taux de séropositivité les plus élevés sont observés dans les communes de Zighoud Youcef (18,2 %), Ibn Ziad (16,2 %), Béni Hmidane (13,3 %) et Ain Smara (12 %) (figure 22).

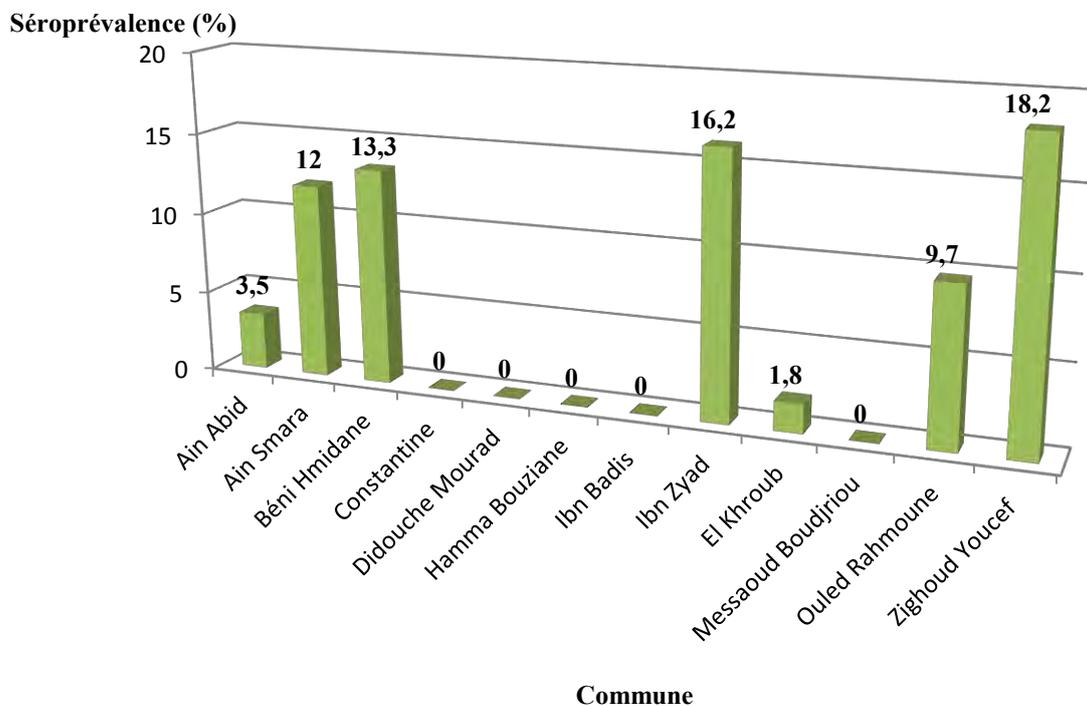


Figure 22 : Taux de séroprévalence de *Chlamydia abortus* chez les brebis dans les 12 communes de la wilaya de Constantine

Le tableau 17 présente la distribution des brebis séropositives et séronégatives vis-à-vis de *C. abortus* en fonction des différents facteurs analysés par le test du Khi-deux. Dix sept variables étaient statistiquement significatives ($p < 0,05$).

Tableau 17: Distribution des brebis séropositives et séronégatives vis-à-vis de *C. abortus* en fonction des différents facteurs analysés par le test du Khi-deux de Pearson

Variable	Catégorie	N	<i>C. abortus</i>		p
			N° +ve (%)	N° -ve (%)	
Age (mois)	12 – 23	53	0 (0)	53 (100)	0.129
	24 – 35	214	19 (8.9)	195 (91.1)	
	36 – 47	240	19 (7.9)	221 (92.1)	
	48 – 59	45	2 (4.4)	43 (95.6)	
Commune	Ain Abid	57	2 (3.5)	55 (96.5)	0.000
	Ain Smara	25	3 (12)	22 (88)	
	Béni Hmidane	60	8 (13.3)	52 (86.7)	
	Constantine	39	0 (0)	39 (100)	
	Didouche Mourad	17	0 (0)	17 (100)	
	Hamma Bouziane	22	0 (0)	22 (100)	
	Ibn Badis	28	0 (0)	28 (100)	
	Ibn Ziad	80	13 (16.2)	67 (83.8)	
	El Khroub	109	2 (1.8)	107 (98.2)	
	Messaoud Boudjriou	20	0 (0)	20 (100)	
	Ouled Rahmoune	62	6 (9.7)	56 (90.3)	
	Zighoud Youcef	33	6 (18.2)	27 (81.8)	
	Antécédents d'avortements	Oui	406	29 (7.1)	
Non		146	11 (7.5)	135 (92.5)	
Taux d'avortement	0%	154	11(7.1)	143 (92.9)	0.001
	<5%	141	9 (6.4)	132 (93.6)	
	5 à 10%	205	9 (4.4)	196 (95.6)	
	10 à 20%	52	11 (21.2)	41 (78.8)	
Avortements répétés	Oui	43	12 (27.9)	31 (72.1)	0.000
	Non	509	28 (5.5)	481 (94.5)	
Taille du troupeau	10 – 99	208	16 (7.7)	192 (92.3)	0.511
	100 – 300	138	7 (5.1)	131 (94.9)	
	>300	206	17 (8.3)	189 (91.7)	
Taux de mortalité chez les jeunes agneaux	<5%	372	17 (4.6)	355 (95.4)	0.000
	5 – 10%	129	13 (10.1)	116 (89.9)	
	10 – 20%	51	10 (19.6)	41 (80.4)	
Existe-t-il des visiteurs de la ferme ?	Oui	453	26 (5.7)	427 (94.3)	0.008
	Non	99	14 (14.1)	85 (85.9)	
Les visiteurs de la ferme	Vétérinaires	362	18 (5)	344 (95)	0.011
	Ouvriers de fermes voisines	28	2 (7.1)	26 (92.9)	
	Vétérinaires et ouvriers	162	20 (12.3)	142 (87.7)	

Fait-on la désinfection du bâtiment ?	Oui	310	26 (8.4)	284 (91.6)	0.253
	Non	242	14 (5.8)	228 (94.2)	
Fréquence de désinfection	1 fois/mois	56	0 (0)	56 (100)	
	1 fois/semestre	17	0 (0)	17 (100)	
	1 fois/an	186	19 (10.2)	167 (89.8)	0.043
	Non réalisée	293	21 (7.2)	272 (92.8)	
Désinfectant utilisé	Lime	227	13 (5.7)	214 (94.3)	
	Biocide	32	6 (18.8)	26 (81.2)	0.029
	Néant	293	21 (7.2)	272 (92.8)	
Alimentation adaptée	Oui	296	28 (9.5)	268 (90.5)	0.033
	Non	256	12 (4.7)	244 (95.3)	
Aliment concentré acheté du marché local	Oui	516	31 (6)	485 (94)	0.000
	Non	36	9 (25)	27 (75)	
Circulation des animaux domestiques et nuisibles dans la ferme	Chats	84	5 (6)	79 (94)	
	Rats	25	1 (4)	24 (96)	
	Oiseaux	38	0 (0)	38 (100)	0.090
	Chiens	14	3 (21.4)	11 (78.6)	
	Toutes espèces citées	391	31 (7.9)	360 (92.1)	
Présence de locaux de mise bas	Oui	251	14 (5.6)	237 (94.4)	0.189
	Non	301	26 (8.6)	275 (91.4)	
Vaccination contre la clavelée	Oui	225	7 (3.1)	218 (96.9)	0.001
	Non	327	33 (3.1)	294 (89.9)	
Origine des animaux	Nés dans la ferme	236	21 (8.9)	215 (91.1)	
	Achetés	57	11 (19.3)	46 (80.7)	0.000
	Mixte	259	8 (3.1)	251 (96.9)	
Problème de rétention placentaire	Oui	43	1 (2.3)	42 (97.7)	0.352
	Non	509	39 (7.2)	470 (92.8)	
Problème de mortinatalité	Oui	332	27 (8.1)	305 (91.9)	0.402
	Non	220	13 (5.9)	207 (94.1)	
Mammites	Oui	72	9 (12.5)	63 (87.5)	0.084
	Non	480	31 (6.5)	449 (93.5)	
Arthrites	Oui	76	12 (15.8)	64 (84.2)	0.006
	Non	476	28 (5.9)	448 (94.1)	
Entérites	Oui	30	0 (0)	30 (100)	0.155
	Non	522	40 (7.7)	482 (92.3)	
Infécondité	Oui	121	17 (14)	104 (86)	0.002
	Non	431	23 (5.3)	408 (94.7)	
Métrite	Oui	30	0 (0)	30 (100)	0.155
	Non	522	40 (7.7)	482 (92.3)	
Agneaux chétifs à la naissance	Oui	358	33 (9.2)	325 (90.8)	0.016
	Non	194	7 (3.6)	187 (96.4)	
Septicémie des agneaux	Oui	68	15 (22.1)	53 (77.9)	0.000
	Non	484	25 (5.2)	459 (94.8)	

p : valeur de significativité statistique à 95% d'intervalle de confiance

4.2. Analyse des facteurs de risque associés à l'infection par *C. abortus*

Le modèle de régression logistique a défini quatre facteurs significativement associés à l'infection par *C. abortus*.

La variable « visites d'ouvriers de ferme voisines » codée 0 « non » et 1 « oui » a été révélée facteur de risque d'acquisition de l'infection à *C. abortus* (OR=7,667 ; IC à 95% (OR) = 2,307–27,203). En effet, le risque d'acquies une infection à *C. abortus* est 7 fois plus élevé dans les élevages visités par des ouvriers de fermes voisines.

Les facteurs « septicémie chez les agneaux » (OR=9,971 ; IC à 95% (OR)=2,383–41,713) et « agneaux chétifs à la naissance » (OR= 2,920 ; IC à 95 % (OR)=1,022–8,342) sont significativement associés à l'infection par *C. abortus*. Par ailleurs, la présence de chiens dans la ferme a été définie comme facteur protecteur (OR=0,054 ; IC à 95 % (OR)=0,010–0,294) (tableau 18).

Tableau 18 : Analyse par régression logistique multinominale des facteurs associés à l'infection par *C. abortus* chez les brebis de la wilaya de Constantine

Variables	B ^a	ES ^b	OR ^c	95% IC ^d (OR)	p
Constante	2,968	1,185	-	-	0,012
Visites d'ouvriers de fermes voisines	2,037	0,646	7,667	2,307 ; 27,203	0,002
Présence de chiens dans la ferme	-2,920	0,865	0,054	0,010 ; 0,294	0,001
Agneaux chétifs à la naissance	1,071	0,536	2,920	1,022 ; 8,342	0,045
Septicémie chez les agneaux	2,300	0,730	9,971	2,383 ; 41,713	0,002

Model Khi-deux 43,662 avec degrés de liberté ddl = 10.

Model -2 log-vraisemblance (rapport de vraisemblance) 119,529.

Qualité de l'ajustement de Hosmer-Lemeshow du Khi-deux de Pearson= 102,117, valeur p =0,266.

^a Coefficient de régression logistique Beta non standardisé.

^b Erreur standard.

^c Odds ratio.

^d Intervalle de confiance.

5. Discussion

Cette étude s'est étalée de mars 2011 à janvier 2012 et a concerné un échantillon représentatif de 552 brebis apparemment saines, provenant des 12 communes de la wilaya de Constantine.

Les avortements infectieux des ovins constituent un problème économique important. Leur étiologie demeure dans la majorité des cas inexplicée malgré l'évidence sérologique d'agents abortifs comme *Brucella melitensis*, *Salmonella abortus ovis*, *Chlamydia*, *Coxiella*, etc. Plusieurs études dans le Maghreb ont démontré que les chlamydies sont à l'origine d'une grande partie des avortements infectieux chez les petits ruminants (Hamzy-El Idrissi *et al.*, 1998 ; Rahal *et al.*, 2011). Dans quelques régions de l'Amérique du nord, *C. abortus* est la cause la plus importante d'avortement chez les brebis et serait impliquée dans au moins 10 % des cas répertoriés d'avortements (Rodolakis *et al.*, 1998 ; Martin, 2000).

Cette recherche est la première étude transversale, dans la région, estimant la séroprévalence de l'avortement enzootique des brebis et identifiant les facteurs de risque associés à l'infection par *C. abortus*. L'étude a permis de détecter parmi les sérums préalablement testés par ELISA indirecte non spécifique, ceux contenant des anticorps anti-*C. abortus*. En effet, l'analyse sérologique a été refaite sur le même lot de sérums faisant l'objet des études décrites dans les chapitres I et II et cela au moyen d'un kit ELISA indirecte capable de détecter spécifiquement les anticorps dirigés contre *C. abortus* tout en évitant les réactions croisées avec les anticorps anti-*C. pecorum* que la plupart des ruminants hébergent dans leur tractus digestif.

C. abortus est non seulement à l'origine d'avortements mais aussi de pneumonies, arthrites, mammites et encéphalomyélite. En revanche, *C. pecorum* est isolée souvent dans les fèces d'animaux asymptomatiques, ce qui complique le diagnostic sérologique de l'avortement enzootique des brebis, surtout que certains outils de diagnostic sérologique se basent sur un antigène du genre porté par le LPS commun aux deux espèces. Le test employé dans cette étude utilise un antigène synthétique issu de la MOMP présentant une spécificité pour *C. abortus*.

L'infection à *C. pecorum* est endémique chez les ruminants dans de nombreux pays et cause des encéphalites, pneumonies, entérites, polyarthrites, conjonctivites et des avortements chez les ovins, caprins, bovins et porcins (Berri *et al.*, 2009 ; Osman *et al.*, 2011). Des souches abortives de *C. pecorum* ont été isolées à partir de cas d'avortements ovins et caprins au Maroc et en

Tunisie. Cet agent semble être impliqué aussi dans les avortements des petits ruminants dans les pays du Maghreb (Rekiki, 2004).

Comparé aux résultats obtenus par le kit ELISA LSIVET Ruminant Serum Chlamydiosis[®], où 135 sérums séropositifs se sont révélés séropositifs à *Chlamydia* spp., il a été noté après l'utilisation du kit ID-Screen *Chlamydomphila abortus* Indirect Multi-species[®] que seulement 40 sérums ont donné des signaux positifs à *C. abortus*. Il demeure alors clair que les réponses sérologiques positives, obtenus dans l'étude précédente, étaient représentées dans la majorité par des anticorps dirigés plutôt contre *C. pecorum* (95 sur 552) soit 17,2 % des échantillons testés, contre 40 sur 552 pour *C. abortus* soit une prévalence de 7,2 %.

Le TCF utilise le lipopolysaccharide et présente l'inconvénient de détecter aussi bien une infection à *C. abortus* qu'à *C. pecorum*. Des techniques de diagnostic de type ELISA (Anderson *et al.*, 1995 ; Donn *et al.*, 1997), utilisant un antigène soluble de *C. abortus* et des techniques d'immunofluorescence ont été proposées pour remplacer le TFC, mais se sont avérées de faible sensibilité (Griffiths *et al.*, 1996 ; Jones *et al.*, 1997 ; Kaltenboeck *et al.*, 1997). Un test ELISA utilisant un antigène recombinant basé sur la protéine de 80 à 90 kDa spécifique de *C. abortus* a été développé par l'équipe « chlamydiose » de l'INRA de Nouzilly (Souriau *et al.*, 1994). Plusieurs auteurs recommandent d'utiliser des antigènes protéiques spécifiques pour le diagnostic de cette infection (Cevenini *et al.*, 1991 ; Donn *et al.*, 1997).

Dans l'étude de Salih Alj Debbarh *et al.* (2001), la valeur diagnostique de deux tests, Elisar et TFC a été comparée à partir de sérums de terrain. Une famille de protéines 80 à 90 kDa détectant spécifiquement l'infection à *C. abortus* a été utilisée pour l'Elisar (Souriau *et al.*, 1994). Cette famille de protéines est retrouvée chez *C. abortus*, *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* mais n'a pas été décrite chez *C. pecorum* (Longbottom *et al.*, 1998). Plusieurs études ont démontré que cette protéine est fortement antigénique et constitue un outil intéressant pour détecter l'infection à *C. abortus* sans réaction croisée avec *C. pecorum* (Cevenini *et al.*, 1991 ; Souriau *et al.*, 1994 ; Buendia *et al.*, 1997 ; Longbottom *et al.*, 1998).

Dans cette étude, 7,2 % des brebis sont séropositives et 33,3 % des troupeaux contiennent au moins une brebis séropositive. Ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par d'autres auteurs. Une étude en République Slovaque a révélé une séroprévalence de 11,7 % (Čisláková *et al.*, 2007). Pinheiro J *et al.* (2010) ont rapporté une prévalence de 21,5 % d'anticorps fixant le complément. Une enquête suisse a noté un taux de séropositivité de 19 % (Borel *et al.*, 2004). Une étude en Allemagne a estimé des taux de positivité de 50 à 71 % (Lenzko *et al.*, 2011).

La prévalence de l'avortement enzootique des brebis est de 5 à 50 % en Bretagne (Clarkson et Philips, 1997), de 54,5 % en Lituanie (Bagdonas *et al.*, 2007), de 11 % en Irlande (Markey *et al.*, 1993) et de 32 % au Tyrol (Khaschabi et Brandstatter, 1994). En revanche, les résultats obtenus dans cette étude semblent supérieurs à ceux rapportés par Czopowicz *et al.* (2010) en Pologne où 4,2 % des élevages sont séropositifs.

Les différences constatées dans la séroprévalence de l'avortement enzootique des brebis par rapport aux études mentionnées, sont probablement dues aux différentes méthodes de diagnostic, aux sources différentes des animaux, aux différences dans les méthodes d'échantillonnage en plus de la variabilité des régions. En effet, certaines enquêtes sérologiques utilisent le TFC. Bostedt et Dedie' (1996) ont noté la présence des anticorps anti-*Chlamydia* par le TFC dans 70 % des troupeaux ovins en Allemagne. En Espagne, une séroprévalence de 51 % a été retrouvée par TFC (Mainar-Jaime *et al.*, 1998).

Des études ont démontré que le TFC est moins sensible et moins spécifique que l'ELISA. Dans l'étude de Vretou *et al.* (2007), 3 ELISAs ont été comparés au TFC. L'étude a signalé que la sensibilité et la spécificité des 4 tests étaient comme suit (%) : Pourquier ELISA (80/100), CHEKIT-ELISA (73,3/96,3), cELISA (77,7/98,1), TFC (68,8/88,9). Le TFC a été jugé le moins sensible et le moins spécifique des quatre tests évalués.

Dans l'étude de Borel *et al.* (2004), l'ELISA de type compétitive a été employée sur un pool de sérums et s'est avérée spécifique à *C. abortus*, à moindre coût et a nécessité moins de temps comparée à d'autres approches.

Wilson *et al.* (2009) ont comparé quatre ELISA développés dans l'institut de recherche de Moredun (une préparation de corps élémentaires (EB), une préparation de la membrane externe de l'entité de l'agent (SolPr) et deux fragments de la protéine recombinante (rOMP90-3, Romp90-4) avec trois kits commerciaux : CHEKIT® *Chlamydomphila abortus*, Pourquier® ELISA *Chlamydomphila abortus* et ImmunoComb Ovine *Chlamydomphila* antibody test. Les tests ont été évalués sur 202 sérums d'animaux infectés naturellement, infectés expérimentalement ainsi que sur des sérums d'animaux provenant de troupeaux indemnes d'avortement enzootique ovin. Les résultats ont démontré que les tests EB, SolPr et CHEKIT ELISAs étaient similaires au TFC mais manquaient de spécificité ; en réagissant avec des sérums d'animaux infectés par *C. pecorum*. L'ImmunoComb aussi manquait de spécificité. Le rOMP90-3, le 4-rOMP90 et le Pourquier ELISA étaient les plus spécifiques, bien que le test Pourquier semble moins sensible avec des sérums provenant d'animaux infectés naturellement par *C. abortus*. Dans l'ensemble, le

rOMP90-3 ELISA était le meilleur, avec 100 % de spécificité et une sensibilité élevée (96,8 %). L'étude a conclu que ce dernier test serait une bonne alternative au TFC dans le diagnostic sérologique de l'avortement enzootique des brebis.

En ce qui concerne les facteurs de risque liés à l'infection par *C. abortus*, cette étude a révélé que l'échange de visites des ouvriers de fermes voisines constituerait un facteur de risque associé à l'infection par *C. abortus*. En effet, l'agent pathogène peut être transmis d'un élevage à un autre par l'intermédiaire des ouvriers de la ferme qui contribueraient à la dissémination des bactéries portées par leur vêtements et bottes contaminés par la litière souillée ou par les produits de mise bas des brebis infectées.

Le modèle de régression logistique a identifié la présence des chiens comme facteur protecteur. Ceci peut être expliqué par le fait que les avortons et placentas sont aussitôt mangés par les chiens ce qui contribuerait à l'élimination des sources potentielles de contamination de l'environnement par *C. abortus*. Le chien ne semble pas être un réservoir pour *C. abortus*.

Le modèle vient confirmer l'implication de *C. abortus* comme agent étiologique majeur de naissance d'agneaux chétifs, difficiles à élever et des cas de septicémies mortelles chez ces jeunes sujets infectés.

Très peu d'études définissent les facteurs de risque associés à l'infection par *C. abortus* chez les ovins. D'après Santos *et al.* (2012), la séropositivité à *C. abortus* est significativement associée aux antécédents d'avortements et l'introduction de mâles reproducteurs constitue un facteur de risque d'acquisition de l'infection chez les caprins.

Selon une étude menée par Pinheiro *et al.* (2010) au Brésil, la localisation géographique des ovins constituerait un facteur de risque. Dans l'étude de Mainar-Jaime *et al.* (1998), être un animal laitier est considéré comme facteur de risque tandis que des distances de plus de 500 mètres entre les fermes est un facteur protecteur. L'étude de Talafha *et al.* (2012) chez les bovins suggère que le faible effectif du troupeau est un facteur de risque alors que l'usage de désinfectants, le balayage du bâtiment d'élevage et son nettoyage à l'eau seraient des facteurs protecteurs.

Dans cette étude, la prévalence de l'infection diminuait avec l'âge ($p < 0,05$). En outre, une différence significative a été notée entre les différentes communes. Les taux de séropositivité les plus élevés ont été notés dans quatre communes (Béni Hmidane, Zighoud Yousef, Ibn Ziad et Ain Smara).

Il s'agit de communes limitrophes à la wilaya de Mila où le mouvement des animaux et les échanges commerciaux non contrôlés d'ovins sont fréquents. En revanche, l'analyse univariée a révélé qu'aucune corrélation significative n'existait entre la séropositivité vis-à-vis de *C. abortus* et l'effectif du troupeau. L'analyse par le test de Khi-deux, des résultats émanent de l'étude d'Al-Qudah *et al.* (2004) en Jordanie, a conclu qu'il y avait une forte corrélation entre les taux de séropositivité d'anticorps fixant le complément et la taille du troupeau.

6. Conclusion

La prévalence de l'avortement enzootique des brebis dans la wilaya de Constantine est de 7,2 %. Par ailleurs, 33,3 % des élevages ovins renferment au moins une brebis séropositive. La chlamydie ovine semble sévir de façon enzootique et à bas bruits.

Les communes de Zighoud Youcef, Ibn Ziad, Béni Hmidane et Ain Smara sont les communes où les taux de séropositivité les plus élevés ont été notés.

La catégorie d'âge entre 24 et 35 mois est celle présentant les taux de séropositivité les plus élevés (8,9 %). L'échange de visites entre ouvriers de fermes voisines constitue un facteur de risque d'acquisition de l'infection à *C. abortus*. En revanche, la naissance d'agneaux chétifs et les cas de septicémie des agneaux sont la conséquence de l'infection par *C. abortus*.

Le diagnostic sérologique permet seulement de prouver que l'animal a été en contact avec l'agent pathogène sans pouvoir confirmer si l'infection est active ou non. Seul un diagnostic direct par bactérioscopie, par recherche de l'antigène par ELISA ou par la mise en évidence de l'ADN bactérien par PCR dans les prélèvements d'écouvillons vaginaux, de tissus fœtaux ou de placentas permettrait d'identifier les animaux excréteurs de *C. abortus*.

Chapitre IV.

*Caractérisation moléculaire de Chlamydia abortus par
PCR-RFLP à partir de prélèvements de tissus
fœtaux et de placentas ovins*

Chapitre IV

Caractérisation moléculaire de *Chlamydia abortus* par PCR-RFLP à partir de prélèvements de tissus fœtaux et de placentas ovins

1. Introduction

Un avortement se définit comme la perte du fœtus à n'importe quel moment de la gestation. Il représente une importante part des pertes d'agneaux avant le sevrage. Ainsi, il demeure important d'en diagnostiquer la cause. En effet, il serait possible d'établir un diagnostic dans 40 à 50 % des cas (Kirkbride, 1993) et d'en limiter alors les pertes (Dubreuil et Arsenault, 2003).

L'avortement enzootique des brebis est caractérisé par une placentite suivie d'avortement. Celui-ci est généralement répertorié durant les deux à trois dernières semaines de la gestation. Par ailleurs, les brebis infectées par *C. abortus* peuvent ne pas avorter et délivrer des agneaux chétifs.

Le diagnostic clinique de l'avortement enzootique des brebis est souvent difficile, puisque les caractéristiques épidémiologiques, les signes cliniques et lésionnels ne sont pas spécifiques à l'infection et sont fréquemment observés lors d'infection par d'autres agents abortifs tels que *Salmonella*, *Brucella*, *Rickettsia*, *Toxoplasma* et *Campylobacter* spp. (Marsilio *et al.*, 2005). Les techniques sérologiques quand à elles manquent de spécificité car elles sont souvent basées sur l'utilisation de préparations dont les principales composantes sont le LPS et la MOMP, communs aux Chlamydiae et qui peuvent générer des réactions croisées avec des bactéries à Gram négatif (Longbottom *et al.*, 2002 ; Aitken et Longbottom, 2004). D'autre part, une réponse sérologique traduite par l'élévation du titre d'anticorps anti-*C. abortus* est fréquente après un avortement ou la naissance d'un agneau mort-né mais ne se produit pas systématiquement (OIE, 2013).

Ainsi, le recours aux examens de laboratoire notamment l'isolement et l'identification de *C. abortus*, sa détection ou de son ADN dans les produits d'avortements ou dans les sécrétions vaginales issues de brebis avortées demeure indispensable. En effet, la PCR permet de détecter de très faibles quantités d'un génome exogène dans les différents types de prélèvements. Dans la présente recherche, la caractérisation moléculaire de *C. abortus* a été effectuée par PCR-RFLP.

2. Objectifs

Cette recherche a pour but de :

- Détecter *C. abortus* dans l'ADN extrait des échantillons congelés de tissus d'avortons, de mort-nés et de placentas ovins.
- Evaluer la technique PCR comme outil de diagnostic direct de l'avortement enzootique des brebis en élevage ovin.
- Identifier les organes fœtaux infectés par *C. abortus*.
- Connaitre la séquence nucléotidique partielle de la souche algérienne de *C. abortus*.
- Analyser histologiquement les placentas infectés par *C. abortus*.

3. Matériel et méthodes

3.1. Cadre de l'étude

L'étude s'est déroulée durant la période allant de septembre 2012 à janvier 2013. Les prélèvements provenaient d'élevages ovins issus de six communes de la wilaya de Constantine au nord-est algérien (Ain Abid, Béni Hmidane, Ibn Ziad, Ouled Rahmoune, Zighoud Youcef et Ain Smara).

3.2. Recueil des échantillons d'avortons et placentas ovins

Les échantillons biologiques représentés par les fœtus avortés ou mort-nés et placentas ovins ont pu être collectés auprès des éleveurs ayant bien voulu participer à l'étude. Après identification, les échantillons ont été bien emballés dans du plastique et placés dans la glacière portative avec bloc de froid de conservation puis acheminés aussitôt au laboratoire. Au total, 8 avortons, 2 mort-nés et 8 placentas ont pu être collectés (figures 24 et 25).

Des prélèvements de sang ont été prélevés de la veine jugulaire des brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort-né puis analysés pour la présence des anticorps anti-*Chlamydomphila abortus* par le kit ID-Screen *Chlamydomphila abortus* Indirect Multi-species selon les instructions du fabricant.

Arrivés au laboratoire, les prélèvements ont été placés sur un plan de travail propre. Après examen macroscopique du placenta et fœtus, il a été procédé à l'autopsie de ce dernier. Un total de 104 prélèvements issus des différents tissus fœtaux et placentas ont pu être récolté.

Pour chaque tissu deux prélèvements ont été séparément mis dans deux pots stériles en plastique.

Le premier a été congelé – 20°C jusqu'à réalisation de la PCR, tandis que le deuxième a été fixé au formaldéhyde à 5 % pour 24 heures et conservé à température ambiante jusqu'à réalisation de l'examen histologique.

Les informations relatives à l'âge des brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort né, les antécédents d'avortement ou de mortinatalité chez la brebis en question ainsi que la taille du troupeau ont été recueillis auprès des propriétaires.

3.3. Préparation des prélèvements d'avortons et placentas ovins

Chaque échantillon a été coupé à l'aide d'une lame de scalpel stérile, puis redécoupé en petits morceaux avant de procéder à l'extraction. Des fragments d'environ 25 mg de chaque tissu ont été utilisés. La quantité de prise d'essai utilisée pour la rate possédant un nombre très élevé de cellules par rapport à la masse n'a pas dépassée 10 mg. Un cube de 2 mm (à peu près de cette taille ■) de la plupart des tissus animaux pèse approximativement 10 à 15 mg (figure 26).



Figure 23 : Mort-nés ovins (photographies personnelles)



Figure 24 : Avortons ovins (photographies personnelles)

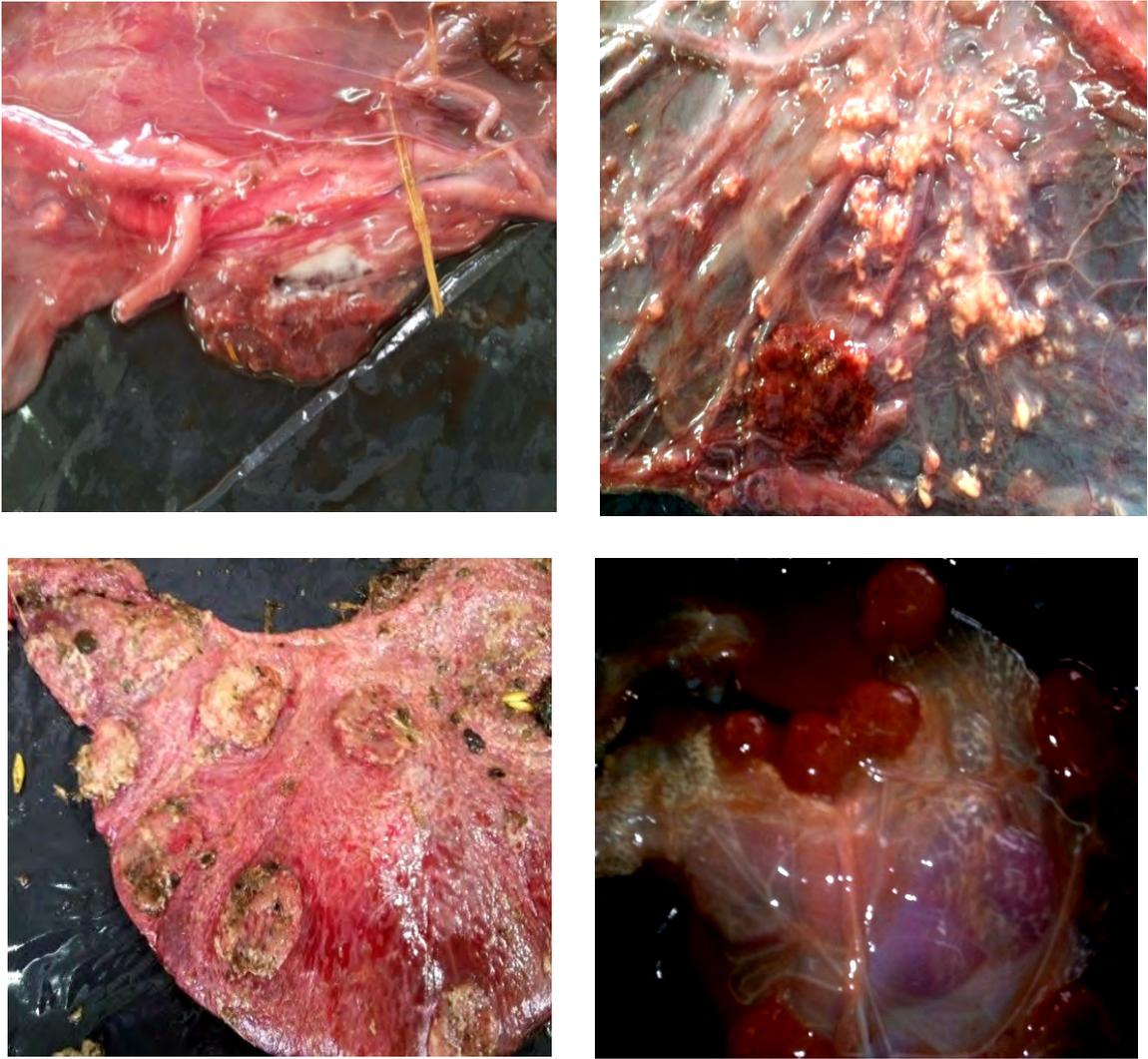


Figure 25 : Placentas ovins issus des cas d'avortements (photographies personnelles)



Figure 26 : Préparation des échantillons de tissus fœtaux et placentas ovins avant extraction d'ADN (photographie personnelle).

3.4. Extraction manuelle de l'ADN à partir de tissus animaux

L'ADN de tous les échantillons a été extrait au moyen du kit d'extraction par colonne de silice de type QIAGEN DNeasy Blood & Tissue kit, Qiagen, Hilden, Allemagne. Le protocole standard recommandé par Qiagen a été suivi.

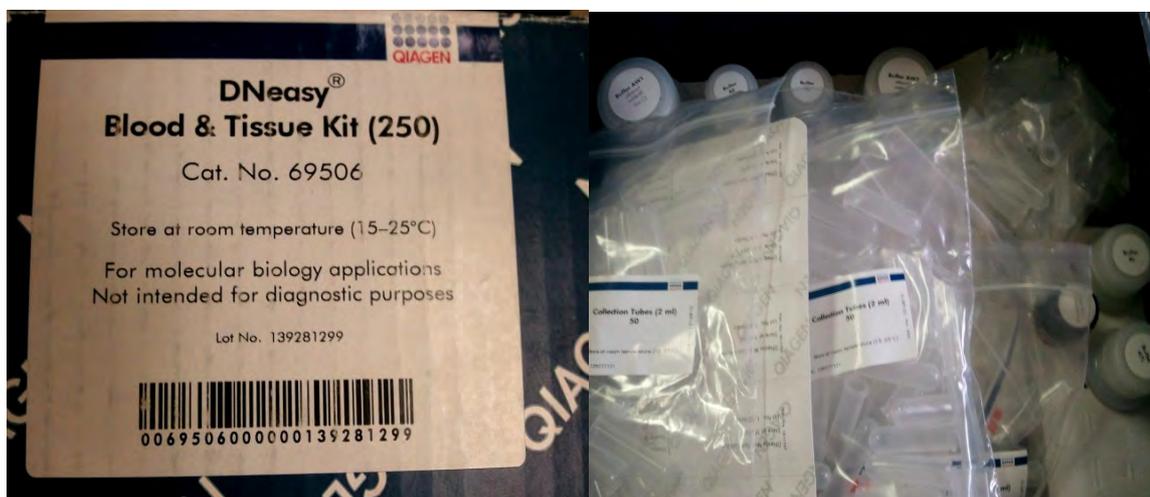


Figure 27 : Kit utilisé dans l'extraction d'ADN "QIAGEN DNeasy Blood & Tissue kit"

3.4.1. Principe de l'extraction manuelle par adsorption sur colonne

Le kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen est basé sur le principe des interactions ioniques et utilise des colonnes contenant des membranes de silice capable de retenir l'AND de manière spécifique en ajustant le pH et les conditions salines : l'ADN est retenu sur une membrane de gel de silice contenue dans une colonne à microcentrifugeuse en présence de sels chaotropiques qui assure la dénaturation des molécules d'acides nucléiques. La préparation passe sur une colonne de filtration. Ainsi, les protéines, les lipides et les polysaccharides ne sont pas retenus par la membrane. Après lavage de la membrane qui permet de débarrasser l'échantillon des contaminants, l'ADN est ensuite élué avec le tampon d'éluion AE fourni dans le kit (solution aqueuse contenant très peu de sel).

3.4.2. Protocole expérimental

En premier lieu, un thermomixeur a été préchauffé à 56°C. Comme les tampons ATL et AL ont formé des précipités au cours de leur conservation. Ceux-ci ont nécessité leur incubation à 56°C afin de dissoudre les précipités.

Avant de commencer, un volume approprié d'éthanol à 100% a été ajouté aux tampons AW1 (Qiagen) et AW2 (Qiagen) fournis sous forme concentrée.

Le protocole d'extraction manuelle de l'ADN à partir des tissus d'avortons et placentas se résume comme suit :

1. Placer 25 mg de tissu (jusqu'à 10 mg de rate) coupés en petits morceaux dans un tube de 1,5 ml et ajouter 180 µl de tampon ATL (Qiagen).
2. Ajouter 20 µl de Protéïnase K (Qiagen), mélanger en vortexant et incuber à 56°C jusqu'à lyse complète du tissu (pendant toute la nuit). Vortexer de temps à autre au cours de l'incubation pour homogénéiser l'échantillon.
3. Vortexer 15 secondes. Ajouter 200 µl de tampon AL (Qiagen) à l'échantillon, mélanger vigoureusement en vortexant.
4. Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100%) à l'échantillon et mélanger vigoureusement.
5. Déposer le mélange dans la colonne DNeasy placée dans un tube collecteur de 2 ml (Qiagen). Centrifuger 1 minute à $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Jeter l'effluent et le tube collecteur.
6. Placer la colonne DNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (Qiagen), ajouter 500 µl de tampon AW1 (Qiagen) et centrifuger 1 minute à $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Jeter l'effluent et le tube collecteur.
7. Placer la colonne DNeasy dans un tube collecteur de 2 ml (Qiagen), ajouter 500 µl de tampon AW2 (Qiagen) et centrifuger 3 minutes à 13000 tours/min afin de sécher la membrane DNeasy. Jeter l'effluent et le tube collecteur.
Après centrifugation, sortir avec précaution la colonne DNeasy du tube collecteur afin que la colonne ne touche pas l'effluent.
8. Placer la colonne DNeasy dans un tube propre de 1,5 ml ou de 2 ml et l'éluer en déposant 200 µl de tampon AE (Qiagen) directement sur la membrane DNeasy. Incuber 1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm).
9. Conserver l'ADN à -20°C jusqu'à son utilisation.

3.5. Les amorces et fragment d'ADN cible

La paire d'amorces Ch1 et Ch2 a été utilisée pour l'amplification d'une portion du gène *omp2* codant pour une protéine majeure de la membrane externe des *Chlamydiae*. Celle-ci est spécifique et très conservée au sein de cette famille (Hartley *et al.*, 2001).

La PCR permettra d'amplifier l'ADN cible du gène *omp2* (outer membrane protein 2) mesurant 587 pb, balisé par le couple d'amorces dont la séquence nucléotidique est représentée dans le tableau 19.

Tableau 19 : Séquence des oligonucléotides Ch1 et Ch2 utilisés dans la PCR (Hartley *et al.*, 2001)

Amorces	Séquence 5' → 3'	Position
Sens :	ATG TCC AAA CTC ATC AGA CGA G	529 à 550
Anti-sens :	CCT TCT TTA AGA GGT TTT ACC CA	1093 à 1115

3.6. Amplification de l'ADN de *Chlamydia* spp. : la PCR proprement dite

3.6.1. Préparation du mélange réactionnel

Pour chaque échantillon à tester, un mélange réactionnel de 20 µl a été préparé sous une hotte PCR (EBSCO®). Le mélange de réaction PCR (mix) utilisé dans cette étude est le 5x FIREPol® Master Mix. Ce mix est prêt à l'emploi et contient tous les composants pour une PCR à l'exception des amorces, de l'eau et de l'ADN cible. En effet, le 5x FIREPol® Master Mix renferme les composantes suivantes :

- FIREPol ADN polymérase.
- 5x Reaction Buffer B.
0.4 M Tris-HCl, 0.1 M (NH₄)₂ SO₄, 0.1% w/v Tween-20.
- 12.5 mM MgCl₂.
1x PCR solution – 2.5 mM MgCl₂.
- 1 mM dNTPs.
1x PCR solution – 200 µM dATP, 200 dCTP, 200 µM dGTP et 200 µM dTTP.
- Un colorant bleu.
- Un colorant jaune.

Les volumes des composants utilisés pour la réaction de PCR pour les échantillons à tester, les témoins positifs et négatifs sont présentés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Volume des composants utilisés dans la réaction d'amplification d'ADN de *Chlamydia*

Composants	Échantillon à tester	Témoin positif	Témoin négatif
5x FIREPol® Master Mix	4 µl	4 µl	0 µl
Amorce « sens »	1 µl	1 µl	0 µl
Amorce « anti-sens »	1 µl	1 µl	0 µl
ADN extrait	3 µl	0 µl	0 µl
ADN <i>Chlamydomydia psittaci</i>	0 µl	1 µl	0 µl
Eau ultra pure	11 µl	13 µl	20 µl
Volume total	20 µl	20 µl	20 µl



Figure 28 : Composants pour la réaction d'amplification d'ADN à *Chlamydia* spp.

3.6.2. Protocole PCR

La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur Genpro® de marque BIOER® suivant le programme cyclique suivant :

En premier lieu, un cycle de dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 2 minutes. Suivi d'une série de 35 cycles d'amplification. Chaque cycle comporte une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, une étape d'hybridation des amorces à 56°C pendant 1 minute, une étape d'élongation de l'ADN à 72°C pendant 1 minute et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes (tableau 21). En dernier lieu, le thermocycleur est réglé à 4°C pour conservation du mélange réactionnel jusqu'à son utilisation (figure 29).

Tableau 21 : Cycles de la PCR pour amplification de *C. abortus*

Opération	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94°C	2 minutes	1
Dénaturation	94°C	1 minute	
Hybridation	56°C	1 minute	35
Élongation	72°C	1 minute	
Élongation finale	72°C	5 minutes	
Conservation	4°C	∞	



Figure 29 : Réaction d'amplification d'ADN réalisée dans le thermocycleur Genpro BIOER®

3.7. Révélation des produits d'amplification

La révélation des amplicons s'est réalisée sous une lumière ultraviolette (UV) après migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% préparé dans 100 ml de TBE 1x (tampon Tris-Borate-EDTA).

3.7.1. Préparation du tampon TBE 1x

Le tampon TBE 1x est utilisé pour la réalisation du gel d'agarose et le bain d'électrophorèse. Ainsi, un volume de 1000 ml du tampon TBE 1x a été préparé en rajoutant 900 ml d'eau distillée à 100 ml de tampon TBE 10x en solution (Bio basic Inc®).

3.7.2. Préparation du gel d'agarose 1,5 %

En premier lieu, peser 1,5 g d'agarose (Bio basic Inc[®]) à l'aide d'une balance analytique (KERN[®]).

En second lieu, dans une fiole Erlenmeyer mélanger la quantité d'agarose à 100 ml de tampon TBE 1x et porter à ébullition dans un four à micro-ondes pendant 2 minutes tout en agitant de temps à autre afin de dissoudre complètement l'agarose dans le tampon puis retirer rapidement dès l'apparition des bulles.

Rajouter ensuite 7,5 µl de bromure d'éthidium (BET) (Promega[®]) et mélanger par agitation. Le BMT se lie à l'acide nucléique et fluoresce sous UV.

Les joints fournis avec la cuve sont placés afin de fermer le support horizontal du gel. Les peignes sont aussi positionnés et qui constitueront les puits de dépôt des échantillons. Finalement, le gel d'agarose est coulé lentement sur 4 mm d'épaisseur puis laissé refroidir à température ambiante jusqu'à polymérisation et formation d'un gel d'apparence opalescente (pendant environ 30 minutes).

3.7.3. Migration des produits d'amplification : l'électrophorèse

Une fois la polymérisation du gel d'agarose effectuée, les peignes formant les puits et les joints sont délicatement retirés. Le gel d'agarose est transféré dans la cuve d'électrophorèse tout en s'assurant qu'il est submergé de tampon TBE 1x. D'éventuelles bulles d'air dans les puits sont retirées à l'aide d'un embout de micropipette.

La technique d'électrophorèse repose sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent de la cathode à l'anode de la cellule d'électrophorèse.

Ainsi, 10 µl de chaque échantillon à tester sont déposés à l'aide d'une pipette de précision dans chaque puits de même que les témoins positifs et négatifs. La taille des fragments d'ADN est estimée grâce à un marqueur de taille moléculaire (DNA ladder), sélectionné pour donner des bandes de 100 à 1000 paires de base (Bio Basic Inc[®]). Celui-ci est déposé simultanément dans le premier et dernier puits à raison de 5 µl. Le générateur branché à la cuve d'électrophorèse est mis en marche et une tension de courant de 120 volts est appliquée afin de permettre la migration des produits d'amplification pendant 45 minutes.

3.7.4. Révélation des bandes d'ADN

Les migrations des produits d'amplification sont révélées sur un transilluminateur ultraviolet à 312 nm (Major Science[®]) pendant deux secondes. Les gels sont photographiés avec le système d'imagerie AlphaDigiDoc[®] RT, Alpha Innotech (figure 30).



Figure 30 : Système d'imagerie AlphaDigiDoc[®] RT, Alpha Innotech pour photographie du gel

3.8. Purification des produits d'amplification sur gel d'électrophorèse

Les produits d'amplification ont été purifiés en utilisant le kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up system, REF A9280 (Promega, Madison, USA).

Toutes les étapes ont été réalisées à température ambiante. D'abord, un volume de 75 ml d'éthanol à 95% a été ajouté à la « Membrane Wash Solution ».

En premier lieu, la bande d'ADN cible (587 bp) a été excisée à partir du gel d'électrophorèse à l'aide d'un scalpel, fractionnée en petits morceaux puis mise dans un tube eppendorf de 1,5 ml.

En second lieu, un volume de 10 µl de la « Membrane Binding Solution » a été rajouté. Le mélange a été vortexé et chauffé à 65°C jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Ensuite, la « Wizard[®] SV minicolumn » a été insérée dans le tube collecteur.

Ainsi, le mélange précédent a été transféré dans la « Wizard[®] SV minicolumn » et incubé pendant 1 minute. La colonne d'adsorption a été centrifugée à 14000 rpm pendant 1 minute puis le tube collecteur a été vidé.

Un volume de 700 µl de la « Membrane Wash Solution » a été ajouté. Le mélange a été centrifugé à 14000 pendant 1 minute puis un volume de 500 µl de la « Membrane Wash Solution » a été additionné et encore centrifugé à 14000 pendant 5 minutes. Le tube collecteur a été vidé à nouveau. Il a été procédé par la suite à une centrifugation à tube ouvert pendant 5 minutes à 14000 de façon à évaporer toute trace d'éthanol résiduelle. La « Wizard[®] SV minicolumn » a été transférée dans un tube d'élution de 1,5 ml propre. Ensuite, un volume de 50 µl de « Nuclease Free Water » a été ajouté. Le mélange a été incubé pendant 1 minute puis centrifugé à 14000 pendant 1 min. En dernier lieu, la « Wizard[®] SV minicolumn » a été jetée et l'ADN purifié stocké à - 20°C.

3.9. Etude du profil de restriction enzymatique des produits amplifiés par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Un volume de 10 µl d'ADN purifié de chaque échantillon à tester a été incubé avec 1 U de l'enzyme *AluI* (New England Biolabs[®], Schwalbach, Germany), 2 µl du tampon 10x (New England Biolabs[®], Schwalbach, Germany) et 7 µl d'eau stérile pendant 1 heure dans un incubateur à 37°C.

Les fragments de produits d'amplification du gène *omp2* digérés par l'enzyme *AluI* ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % additionné de bromure d'éthidium. La migration a été effectuée à 120 volts de tension et pendant 50 minutes.



Figure 31 : Enzyme *AluI* et tampon New England Biolabs[®] utilisés pour la digestion des produits d'amplification

3.10. Séquençage et analyses phylogénétiques

Le séquençage des produits purifiés de PCR a été réalisé par la société Macrogen, Korea. Les séquences obtenues ont été visualisées et vérifiées grâce aux logiciels BioEdit. Une recherche sur la banque de données NCBI répertoriant les séquences nucléotidiques connues notamment de *Chlamydia* spp. a permis par l'intermédiaire du programme BLAST de recenser une dizaine de séquences présentant une similarité avec les séquences d'entrée.

L'alignement des séquences ainsi que les pourcentages de similarité nucléotidique de la séquence partielle du gène *omp2* avec le gène correspondant d'autres espèces de *Chlamydia* spp. a été réalisé par alignement multiple des séquences et les applications CLUSTAL W du logiciel DNASTAR® Lasergene® version 7. L'arbre phylogénétique ou dendrogramme a été générée à l'aide de l'application MegAlign® du logiciel DNASTAR® Lasergene® version 7.

3.11. Histopathologie

Les placentas de brebis avortées, fixées préalablement au formol à 5% ont fait l'objet d'un examen histopathologique. L'objectif était de rechercher des lésions de placentite caractérisant les avortements à *C. abortus*. Ainsi, des blocs de paraffine ont été préparés à partir de portions de la zone cotylédonnaire et intercotylédonnaire. Ensuite, des sections tissulaires de 5 micromètres d'épaisseur ont été coupées de chaque bloc à l'aide d'un microtome puis colorées à l'Hématoxyline-Eosine et visualisés au microscope optique à 10x et 40x. Des photographies ont été prises.



Figure 32 : Placenta ovins fixés au formol (photographie personnelle)

3.12. Analyse statistique

Le logiciel statistique SPSS version 20 a été utilisé dans le traitement et l'analyse des données. La relation entre quelques facteurs individuels et de troupeau et les résultats de PCR a été analysée par le test de Khi-deux.

4. Résultats

4.1. Statut sérologique des brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort-né vis-à-vis de la chlamyphilose

La recherche moléculaire de *C. abortus* a concerné dix huit élevages ovins provenant de six communes de la wilaya de Constantine (Ain Abid, Béni Hmidane, Ibn Ziad, Ouled Rahmoune, Zighoud Youcef et Ain Smara). Un total de 8 avortons, 2 foetus mort-nés et 8 placentas ovins ont pu être collectés dans les 24 à 48 heures suivant la survenue d'avortement ou la délivrance d'agneaux mort-nés.

Ces échantillons provenaient de brebis dont le statut sérologique vis-à-vis de l'avortement enzootique ovin a été déterminé par analyse sérologique par le test d'ELISA à l'aide d'un kit détectant spécifiquement les anticorps dirigés contre *C. abortus*. En effet, sur les 18 brebis testées, 10 soit 55,5% se sont révélées *C. abortus* séropositives.

4.2. Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR

A l'issue de l'extraction de l'acide nucléique, la PCR a été réalisée sur la totalité des échantillons (N=104). La paire d'amorces Ch1/Ch2 a été utilisée dans la réaction d'amplification. Des fragments du gène omp2 spécifique aux *Chlamydiae* et de taille attendue (587 pb) ont été obtenus (figures 33 et 34). L'amplification était identique au témoin positif. Sur les 8 placentas, 4 (**50 %**) étaient *Chlamydia* positifs. Sur les 10 foetus, 6 étaient positif (**60 %**) (tableau 22). Sur l'ensemble des échantillons testés, 26 se sont révélés positifs, soit un taux de positivité global par PCR (Ch1/Ch2) de 25%. D'autre part, 78 prélèvements ont donné des signaux négatifs. Des bandes d'ADN fluorescentes de manière très intense et de taille recherchée, reflétant des quantités importantes en matière d'ADN de *Chlamydia*, ont été obtenues à partir de **4 sur 9** prélèvements de l'**œil** (**44,4 %**) et dans **5 sur 10** échantillons provenant du **cerveau** soit un taux de positivité de **50 %**. Parmi les **6 foetus** considérés positifs, l'ADN à *Chlamydia* a été retrouvé dans le **cerveau** dans **83,3 %** des cas et dans l'**œil** dans **66,7 %** des cas (tableau 23). En outre, de l'ADN *Chlamydia* provenant des prélèvements de **poumon, foie, rein, rate, cœur** et **intestins** a été amplifié. Cependant, l'ADN de *Chlamydia* n'a pas été

retrouvé dans les échantillons d'estomac, contenu stomacal, liquide thoracique et liquide péritonéal. Quelques bandes sont de qualité moyenne, visibles à l'œil nu mais n'apparaissent pas sur les photographies.

Tableau 22 : Nombre et nature des prélèvements *C. abortus* positifs et négatifs par PCR-RFLP

Nature du prélèvement	Nombre testés	Résultat PCR	
		N° +ve (%)	N° -ve (%)
Cerveau	10	5 (50 %)	5 (50 %)
Œil	9	4 (44.4 %)	5 (55.6 %)
Poumon	10	3 (30 %)	7 (70 %)
Foie	10	2 (25 %)	8 (75 %)
Rein	10	2 (25 %)	8 (75 % %)
Rate	10	2 (25 %)	8 (75 %)
Cœur	10	2 (25 %)	8 (75 %)
Intestins	9	2 (22.2 %)	7 (77.8 %)
Estomac	6	0 (0 %)	6 (100 %)
Contenu stomacal	6	0 (0 %)	6 (100 %)
Liquide thoracique	2	0 (0 %)	2 (100 %)
Liquide péritonéal	4	0 (0 %)	4 (100 %)
Placenta	8	4 (50 %)	4 (50 %)
Total	104	26 (25%)	76 (75%)

Tableau 23 : Distribution des résultats positifs et négatifs vis-à-vis de *C. abortus* par PCR-RFLP en fonction des tissus de fœtus testés positifs (N=6, n=22)

Tissus / Fœtus	1	2	3	4	5	6
Cerveau	+	+	+	+	-	+
Œil	-	+	+	-	+	+
Poumon	-	+	+	-	+	-
Foie	-	+	+	-	-	-
Rein	-	+	+	-	-	-
Rate	-	+	+	-	-	-
Cœur	-	+	+	-	-	-
Intestin	-	+	-	-	+	-
Estomac	-	NT	NT	-	-	NT
Liquide thoracique	-	-	-	-	-	-
Liquide abdominal	-	-	-	-	-	-

+ : résultat positif par PCR ; - : résultat négatif par PCR ; NT : non testé.

La figure 33 est une photographie du gel sous UV effectuée pour l'analyse des résultats de PCR.

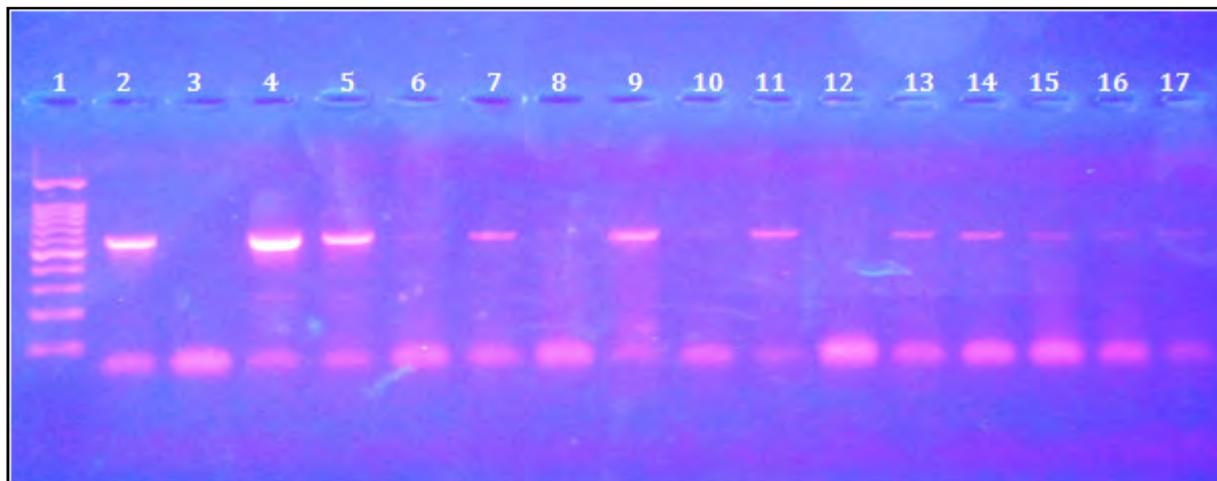


Figure 33 : Révélation sous ultra-violets des fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir des amorces Ch1 et Ch2

(1 : Marqueur d'ADN 100 pb, 2 : contrôle positif, 3 : contrôle négatif, 4-17 échantillons à tester)

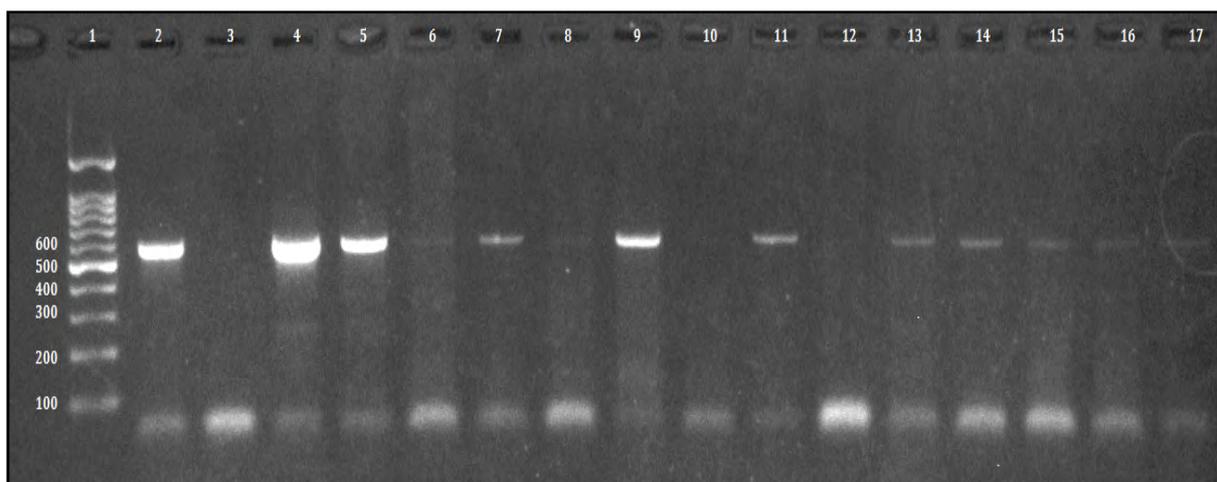


Figure 34 : Photographie de la migration sur gel d'agarose à 1,5 % des produits d'amplification par PCR d'une portion du gène *omp2* avec le couple d'amorces spécifiques Ch1/Ch2

(1 : Marqueur d'ADN 100 pb, 2 : contrôle positif, 3 : contrôle négatif, 4-17 : échantillons à tester)

4.3. Analyse des amplicons par RFLP

La caractérisation moléculaire des produits d'amplification par RFLP a concerné les 26 échantillons positifs par PCR. Ceux-ci ont été soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *AluI*. Les fragments de chaque échantillon ainsi digéré ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %.

Les résultats sont illustrés dans les figures 35 et 36. Tous les échantillons digérés se sont avérés des *C. abortus* car on note qu'il n'y a qu'un seul profil exprimé et que celui-ci semble correspondre à celui exprimé par *C. abortus* ; deux bandes d'ADN de 235 pb et 352 pb.

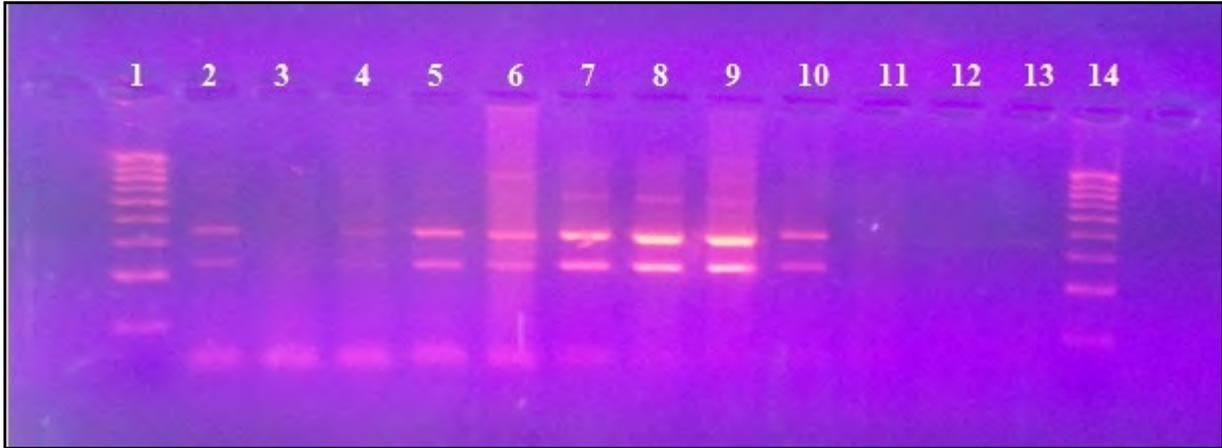


Figure 35 : Révélation sous ultra-violets des fragments d'amplicons du gène *omp2* digérés par l'enzyme *AluI* par technique RFLP

(1,14 : Marqueur d'ADN 100 pb, 2 : contrôle positif, 3 : contrôle négatif, 2-13 : échantillons à tester)

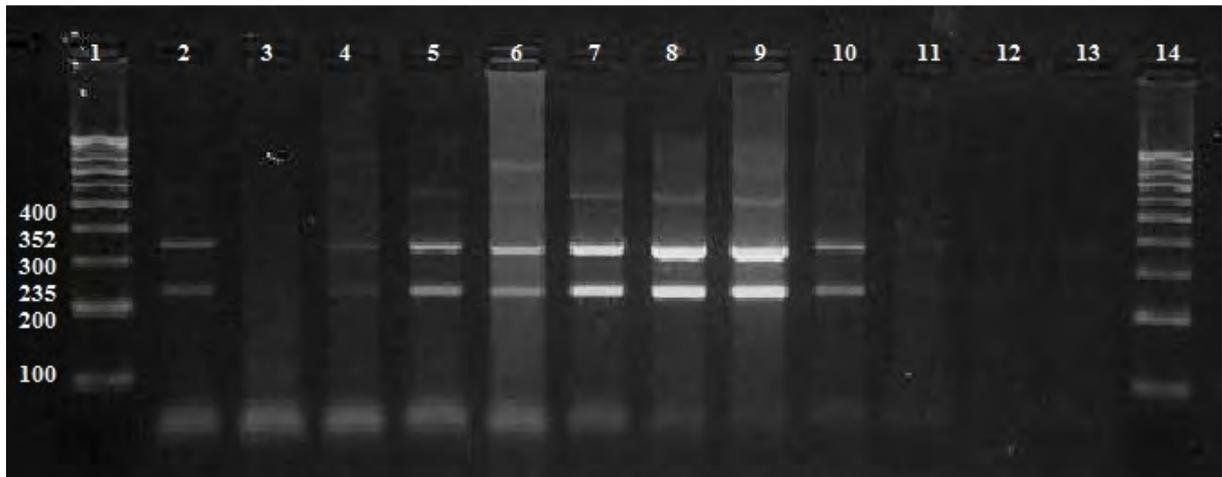


Figure 36 : Photographie de la migration sur gel d'agarose 2% des fragments de restriction enzymatique par *AluI* des amplicons du gène *omp2* de *C. abortus* (Ch1/Ch2)

(1,14 : Marqueur d'ADN 100 pb, 2 : contrôle positif, 3 : contrôle négatif, 2-13 : échantillons à tester)

4.4. Analyse de la relation entre les résultats de la PCR-RFLP et les facteurs liés aux brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort-né

Aucune corrélation significative n'a été retrouvée entre la positivité en PCR-RFLP à *C. abortus* et les facteurs étudiés (tableau 24), à l'exception du facteur « taille du troupeau ». En effet, une différence statistiquement significative ($p < 0.05$) a été retrouvée. D'autre part, l'analyse statistique n'a révélée aucune corrélation significative entre le statut sérologique vis-à-vis de la chlamyphilose et les résultats de PCR-RFLP à *C. abortus* ($p > 0.05$).

Tableau 24 : Analyse par test du Khi-deux de l'association entre les facteurs relatifs aux brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort-né et la positivité en PCR vis-à-vis de l'avortement enzootique des brebis

Facteur	Catégories	Nombre	Valeur <i>p</i>
Nature du prélèvement	Avorton	8	0.407
	Mort-né	2	
	Placenta	8	
Antécédents d'avortements	Oui	13	0.314
	Non	5	
Antécédents de mortinatalités	Oui	16	0.477
	Non	2	
Age de la brebis ayant avorté ou mis bas d'un agneau mort-né	18 mois	8	0.869
	24 mois	2	
	36 mois	8	
Taille du troupeau ovin	10 – 99 têtes	10	0.040*
	100 – 300 têtes	4	
	>300 têtes	4	
Commune	Ain Abid	4	0.216
	Béni Hmidane	5	
	Zighoud Youcef	4	
	Ouled Rahmoune	2	
	Ibn Ziad	2	
	Ain Smara	1	
Statut sérologique vis-à-vis de l'avortement enzootique ovin (<i>Chlamydophila abortus</i>)	Positif	10	0.183
	Négatif	8	

* Association significative ($p < 0.05$)

4.5. Séquençage et analyse phylogénétique

La séquence partielle du gène *omp2* de la souche algérienne amplifiée à partir de tissus fœtaux et de placentas de brebis a été obtenue. Celle-ci est illustrée dans la figure 39. La comparaison par alignement multiple des séquences nucléotidiques du gène *omp2* a démontré que les isolats algériens présentent une similarité de 96 % avec la souche FAS de *Chlamydia abortus*, de 84,3 % avec *Chlamydia caviae* et une très faible similarité avec d'autres souches de *Chlamydia* spp (figure 39). La relation phylogénétique entre ces différentes espèces, basée sur la séquence partielle du gène *omp2* est illustrée dans la figure 40.

GTATGGCGAGTTCATTTGCCAGCGGGAAGATAGAGGCCGCTGCTGCAGAGTCTCTTGCTACAAG
 ATTCATTGCCAGTACCGAAAACCTCAAATGACAATGTTTTGCAAGCAACAGCCAAGAAAGTTAGAT
 TTGGTCGTAACAAAAATCAAAGACAAGAACAAAAACATACTGGCGCTTTCTGTGATAAAGAATTT
 TATCCTTGCGAAGGTGGTCAGTGCCAATCCGTCGATACTACACAAGAATCTTGCTACGGCAAAA
 TGTATTGTGTCCGTGTTAACGATGACTGTAACGTGGAAATTAGCCAAGCTGTACCTGAATATGCA
 ACAGTAGGATCTCCTTATCCTATTGAAATCTTGCTGTAGGTAATAAAGATTGCGTTAATGTTGT
 GATCACTCAACAACCTCCTTGCGAAGTTGAGTTTGTGTCAGCAGTGATCCTGCGACAACACCAACCT
 CAGATAGCAAATTAATCTGGACAATTGATTGCTTAGGTCAAGGTG

Figure 37 : Séquence nucléotidique partielle du gène *omp2* de la souche algérienne *Chlamydia abortus* amplifiée à partir de tissus fœtaux et de placentas de brebis avortées

		Percent Identity											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Divergence	1	■	30.0	39.0	39.2	37.5	38.5	37.7	90.7	35.7	96.0	1	<i>Chlamydia abortus</i> strain FAS.seq
	2	210.5	■	35.7	35.5	34.4	35.0	34.1	28.1	69.1	33.1	2	<i>Chlamydia muridarum</i> outer mambrane prot
	3	127.9	151.8	■	75.8	72.2	72.9	78.1	36.6	35.3	43.2	3	<i>Chlamydia pecorum</i> (omp2).seq
	4	126.0	156.8	29.5	■	73.8	73.9	79.4	35.4	36.1	46.5	4	<i>Chlamydia pneumoniae</i> outer membrane pr
	5	136.7	162.8	35.1	32.5	■	86.3	71.8	36.6	36.7	44.6	5	<i>Chlamydia suis</i> outer membrane protein 2
	6	130.7	157.9	33.8	32.2	15.3	■	74.9	34.8	35.0	46.5	6	<i>Chlamydia trachomatis</i> omp2 gene.seq
	7	137.2	166.8	26.2	24.2	35.6	30.8	■	34.3	35.2	43.5	7	<i>Chlamydomphila abortus</i> strain outer memb
	8	10.0	251.6	141.0	149.7	141.2	154.1	160.3	■	32.6	84.3	8	<i>Chlamydomphila caviae</i> omp2.seq
	9	148.4	40.3	159.0	152.2	149.5	162.0	156.7	175.6	■	34.7	9	<i>Chlamydomphila felis</i> outer membrane prot
	10	4.1	168.7	110.2	95.9	102.4	95.0	110.2	17.6	153.8	■	10	<i>chlamydia algeria</i> .RCseq.seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

Figure 38 : La matrice de similarité de séquence nucléotidique partielle du gène *omp2* de la souche algérienne

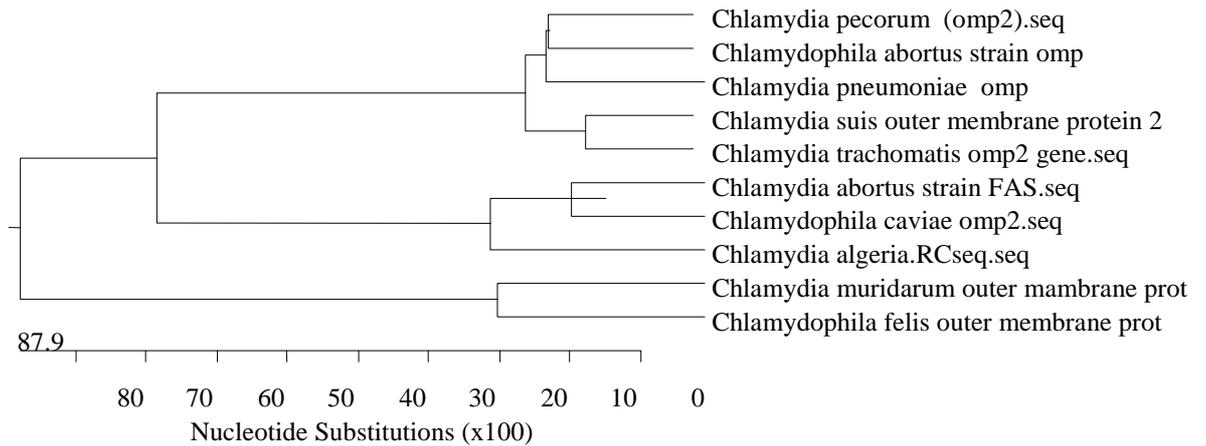


Figure 39 : Arbre phylogénétique basée sur l'analyse des séquences nucléotidiques de 10 espèces de *Chlamydiae*

4.6. Analyse histopathologique des placentas

L'examen histopathologique a démontré l'existence d'une placentite sévère dans les régions cotylédonaire des placentas PCR positifs. Des lésions microscopiques de vascularite, nécrose et abondance de cellules inflammatoires ont été notées témoignant la placentite accompagnant l'infection à *C. abortus* (figure 41).

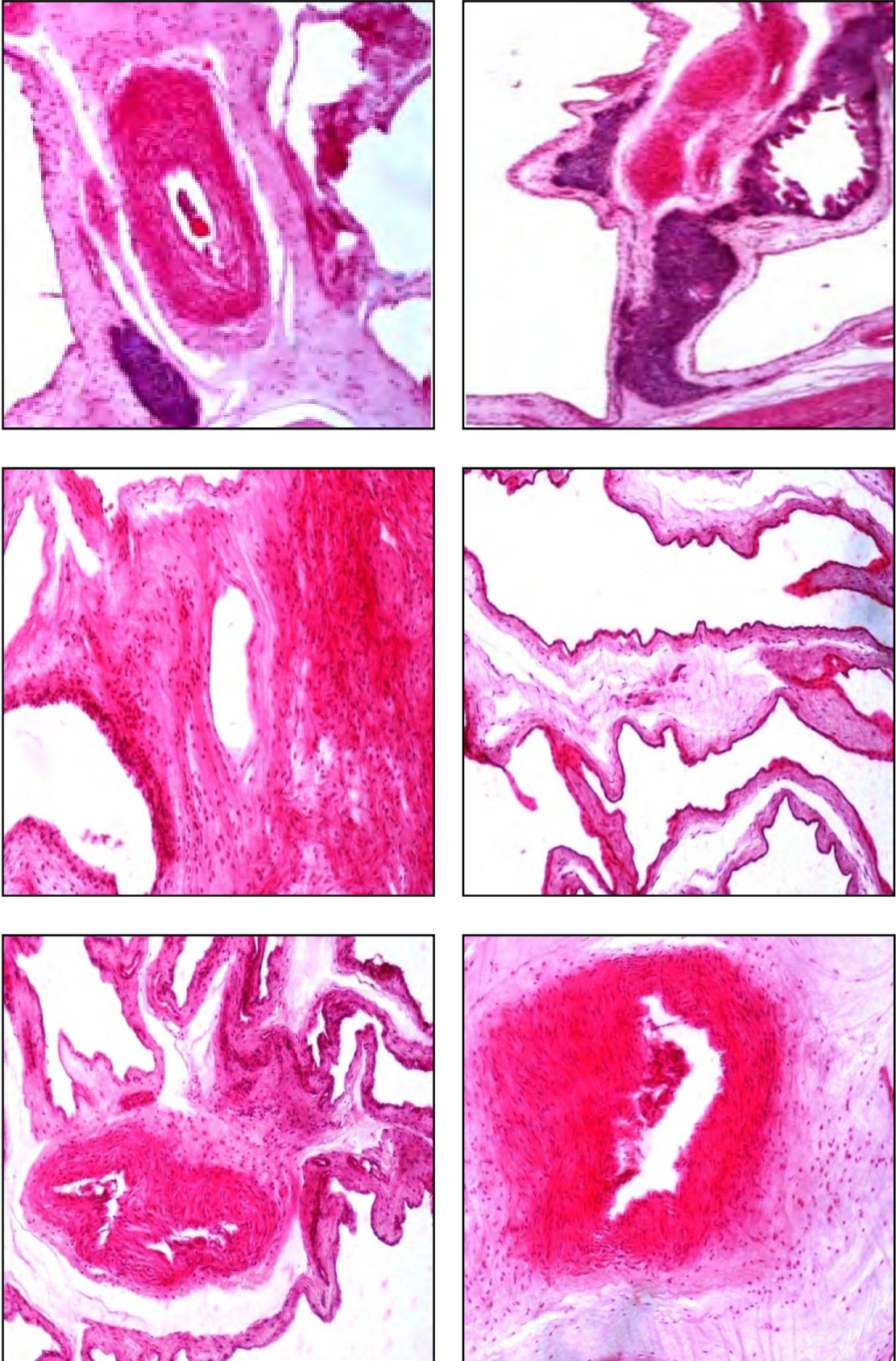


Figure 40 : Nécrose, vascularite avec infiltration de cellules inflammatoires de placentas ovins infectés naturellement par *C. abortus*, HE (photographies personnelles)

5. Discussion

Ce travail est la première étude en Algérie ayant caractérisé, sur un plan moléculaire l'agent de l'avortement enzootique des brebis.

Cette étude a concerné 18 élevages, répartis sur six communes dans la wilaya de Constantine. Ces élevages contenaient au moins une brebis séropositive à *C. abortus*. Ce sont les mêmes élevages qui ont fait l'objet de l'étude décrite dans le chapitre III.

En ce qui concerne le statut sérologique vis-à-vis de *C. abortus*, cette étude a révélé que sur les 18 brebis testées, 10 (55,6 %) présentaient des anticorps spécifiques tandis que 8 (44,4 %) étaient séronégatives. En plus de l'évidence sérologique de l'exposition préalable de ces élevages à l'agent pathogène en question, l'identification de *C. abortus* dans les prélèvements de fœtus et de placentas de brebis a permis de confirmer l'implication de *C. abortus* dans la majorité des cas d'avortements étudiés, bien que sur le plan statistique, aucune corrélation significative n'a été retrouvée entre la séropositivité par ELISA et la positivité en PCR ($p > 0,05$). En fait, les différentes études de la corrélation entre les résultats de la PCR et de la sérologie notent l'absence de concordance. Ainsi, les résultats de la présente recherche sont similaires à ceux retrouvés par Teankum *et al.* (2007) où aucune corrélation n'a été trouvée entre les résultats de l'ELISA et la présence des chlamydies dans la semence de petits ruminants. L'absence de corrélation entre ces deux facteurs a été également relevée dans l'étude de Polkinghorne *et al.* (2009).

En revanche, une corrélation significative a été retrouvée entre la positivité en PCR et l'effectif du troupeau ($p < 0,05$). Ce résultat est en accord avec l'étude de Lenzko *et al.* (2011). En effet, l'augmentation de l'effectif du troupeau semble affecter la probabilité de détecter des animaux infectés par *C. abortus*. Ceci peut être expliqué par le fait que la gestion des élevages et les mesures de biosécurité et d'hygiène sont plus faciles à entreprendre dans les troupeaux à faible effectif.

A travers cette recherche, la présence simultanée de la bactérie mise en évidence par PCR et d'anticorps à un titre significatif ; permet de poser un diagnostic d'infection aiguë. En général, là où est instaurée la prophylaxie des avortements à *Brucella*, les avortements chlamydiens sont mis en évidence. En France, dans le département des Hautes-Alpes, 63 % d'avortements chlamydiens ont été relevés contre 10 % d'avortements brucelliques (Malot *et al.*, 1981). Aussi,

l'incidence des avortements chlamydiens a été estimée à 50 % au Royaume-Uni (Aitken, 2000), et à 39 % en Suisse (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002).

Les échantillons faisant l'objet de l'étude moléculaire sont représentés par des tissus fœtaux d'avortons, de mort-nés mais aussi de placentas. Chez les ovins, la principale source d'infection par *C. abortus*, dans l'environnement, est représentée par le placenta et les avortons. Les animaux venant en contact avec ces matériaux peuvent être contaminés soit par ingestion ou par inhalation. La manipulation au laboratoire ou lors de collecte des prélèvements d'avortons et de placentas présente aussi l'inconvénient du risque de transmission de l'agent zoonotique à l'Homme. L'utilisation d'écouvillons vaginaux pourrait ainsi limiter ce risque et offre la possibilité de détecter les femelles infectées asymptomatiques dès les premiers stades de la gestation (Marsilio *et al.*, 2005).

En médecine humaine et vétérinaire, les tests PCR réalisés sur des tissus provenant de cas d'avortements ou d'écouvillons vaginaux sont considérés les méthodes les plus sensibles disponibles pour le diagnostic des infections chlamydiennes (Shafer *et al.*, 2003 ; Marsilio *et al.*, 2005). La PCR ne requiert pas que les bactéries soient viables, ce qui simplifie la collecte, le transport et la conservation des échantillons. De nombreux tests PCR en temps réelle ont été développés pour la détection et la différenciation des *Chlamydiae* (Pelletier *et al.*, 2006 ; Pantchev *et al.*, 2009). La quantification par PCR en temps réelle de l'ADN extrait de placenta a identifié une moyenne de $2,7 \times 10^7$ génomes de *C. abortus* par microgramme de tissu, ce qui vient confirmer l'hypothèse que ce matériel constitue une source majeure de transmission de *C. abortus* dans un élevage (Livingstone *et al.*, 2009).

Plusieurs zones génomiques, tels que le *omp2*, un gène codant pour la protéine membranaire externe 2, une protéine de 60-kDa riche en cystéine ont été utilisées pour l'identification des espèces et souches de *Chlamydiae* (Watson *et al.*, 1991 ; Anderson *et al.*, 1996 ; Sheehy *et al.*, 1996 ; Marsilio *et al.*, 2005). Le gène *omp2* possède deux régions conservées à l'extrémité 5' entourant un segment variable. Des amorces conçues pour être complémentaires de ces régions conservées ont été utilisées pour amplifier le gène *omp2* de plusieurs espèces de *Chlamydiae* soit par PCR multiplexe ou par analyse des profils de restriction RFLP des séquences amplifiées par PCR (Ossewaarde et Meijer, 1999; Everett et Andersen, 1999 ; Demkin et Zimin, 2005). Dans cette étude, une PCR-RFLP a été utilisée pour l'amplification d'un segment du gène *omp2* par la paire d'amorces (Ch1/Ch2) selon Hartley *et al.* (2001).

Dans cette étude, il a été procédé à la purification des produits de PCR dans le but d'éliminer les réactifs ayant servi à la réalisation de la PCR (amorces, nucléotides, sels, polymérase), qui risquent d'interférer lors de l'utilisation de ces produits dans le séquençage.

Les résultats de cette recherche ont révélé la présence de L'ADN à *C. abortus* dans 4 placentas (50 %) et 6 fœtus (60 %). Dans l'étude de Masala *et al.* (2007), l'ADN chlamydien a été amplifié dans 2,4 % des fœtus et 6,5 % des placentas.

Bien que l'ADN chlamydien a été aussi retrouvé dans les prélèvements fœtaux issus de poumons, foie, reins, rate, cœur et intestins, il a été noté que les prélèvements de cerveau et d'œil sont les tissus contenant le plus d'ADN chlamydien. Il semble alors que ce sont les spécimens de choix à recueillir en vue de la recherche de *C. abortus*.

Par ailleurs, l'ADN cible n'a pas pu être révélé dans les prélèvements de liquide stomacal, liquide thoracique et liquide péritonéal. Ceci peut être du soit à une quantité trop faible d'ADN pour être révélée par PCR ou bien à la présence d'inhibiteurs interférant avec la réaction d'amplification.

La technique de PCR-RFLP permet l'obtention de fragments dont le nombre et la taille varient en fonction de la souche étudiée et de l'enzyme de restriction utilisée. Pour la caractérisation moléculaire de *C. abortus* par PCR-RFLP, c'est le gène *ompA* qui est le plus utilisé. L'utilisation de l'enzyme *AluI* a permis de distinguer les souches de *C. abortus* des souches de *C. pecorum* ainsi que les souches de *C. pecorum* entre elles (Denamur *et al.*, 1991). Les souches de *C. abortus*, *C. caviae* et *C. felis* sont trouvées très homogènes avec cette technique contrairement aux souches de *C. pecorum* (Denamur *et al.*, 1991; Di Francesco and Baldelli, 2002; Zhao *et al.*, 1993). Dans cette recherche, la digestion par *AluI* a révélé une population homogène de profils génétiques de digestion semblable à celui de *C. abortus*.

Certains fragments d'ADN ont été révélés sous forme de bandes peu fluorescentes, visibles à l'œil nu mais n'apparaissant pas dans les photographies du gel. Ceci se traduit par le fait que les échantillons représentatifs renfermaient une quantité faible d'ADN.

La mise en évidence de quelques bandes très fines dans les profils de restriction enzymatique est probablement due à un polymorphisme au niveau des séquences ciblées témoignant peut être d'une éventuelle variabilité génétique de la souche algérienne.

Actuellement, avec la diminution du prix de séquençage, les chercheurs préfèrent séquencer directement le gène *ompA* pour caractériser des nouvelles souches de Chlamydiae (Yousef Mohamad, 2009). Dans cette étude, le séquençage d'ADN a permis de confirmer l'identité des amplicons appartenant à *C. abortus*.

D'autre part, l'analyse phylogénétique a révélé une similarité de 96 % de la souche algérienne avec la souche FAS de *C. abortus*, et une similarité de 84,3 % avec *C. caviae*. En revanche, une très faible similarité avec les autres souches de *Chlamydia* spp. a été conclue.

L'examen histologique des placentas positifs par PCR a révélé la présence de foyers de nécrose, vascularite avec infiltration de cellules inflammatoires témoignant une placentite sévère. Les mêmes constatations ont été décrites dans l'étude de Miller *et al.* (1990). La placentite peut entraîner une insuffisance placentaire à l'origine de l'avortement. Celui-ci résulte d'une combinaison de plusieurs facteurs. La diminution de l'efficacité des échanges fœto-maternels est une conséquence inévitable du processus inflammatoire (Sammin *et al.*, 2009). En outre, l'artérite est une caractéristique distincte de la placentite causée par des champignons et certaines bactéries notamment *C. abortus*. Ainsi, de tels dommages vasculaires sont susceptibles d'altérer la circulation du sang placentaire. Par conséquent, même si les changements inflammatoires sont limités à la zone hilaire du placentome, la capacité fonctionnelle et la viabilité des zones extra-hilaires sont aussi modifiées. En plus, la perturbation de la fonction endocrine du placenta est l'une des séquelles d'une placentite. La placentite causée par *C. abortus* chez les ovins est accompagnée d'une diminution des taux plasmatiques maternels de progestérone se produisant deux semaines plutôt qu'une gestation normale ; une augmentation du taux de 17- β œstradiol et des niveaux élevés de prostaglandine E2 dans les liquides fœtaux (Leaver *et al.*, 1989). En outre, la réponse systémique du fœtus à l'infection peut être très marquée et provoque l'activation prématurée et l'hyperplasie de la corticosurrénale associée à des taux plasmatiques élevés de Cortisol fœtal (Enright *et al.*, 1984).

6. Conclusions

Cette recherche a permis de caractériser sur le plan moléculaire l'un des pathogènes abortifs aux répercussions économiques les plus importantes.

L'ADN à *C. abortus* a pu être isolé à partir de 4 placentas et 6 fœtus ovins. Sur les 104 extraits d'ADN testés par PCR-RFLP, 26 appartenaient à *C. abortus*. 55,5 % des brebis avortées ou ayant mis bas d'un agneau mort-né étaient séropositives par ELISA indirecte spécifique à *C. abortus*.

L'ADN recherché a été retrouvé dans 83,3 % des prélèvements de cerveau des fœtus infectés par *C. abortus* et dans 66,7 % des prélèvements de l'œil. En somme, ces deux types de spécimens peuvent servir comme organes de choix dans les procédures diagnostiques de l'avortement enzootique des brebis.

La positivité en PCR, des échantillons fœtaux et de placentas, représente alors une excellente technique pour démontrer un contexte d'infection avérée des troupeaux par la chlamydophilose abortive ovine.

L'analyse histologique a permis de confirmer la présence de lésions de placentite accompagnant l'infection à *C. abortus*.

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette étude expérimentale a permis de dresser un premier bilan sur la séroprévalence de cinq maladies abortives : la brucellose, la chlamydie, la fièvre Q, la salmonellose abortive et la néosporose. Ainsi, les analyses sérologiques ont démontré que la chlamydie et la fièvre Q sont les maladies abortives les plus dominantes chez les brebis dans la wilaya de Constantine.

De ce fait, cette approche nous a permis de faire le point sur l'avortement enzootique des brebis que bien qu'il s'agisse d'une maladie à déclaration obligatoire à l'échelle nationale, celle-ci ne fait objet d'aucun dépistage ni de mesures prophylactiques sur le terrain.

Au travers des tests sérologiques par ELISA et des données collectées au moyen du questionnaire, entrepris dans l'objectif principale de contribuer à la connaissance de la répartition géographique et de l'épidémiologie de l'avortement enzootique des brebis ; les résultats de l'étude ont permis de remarquer que l'infection par cet agent abortif est largement répandue. En effet, la prévalence individuelle des anticorps vis-à-vis de *Chlamydia* spp a été estimée à 24,5 %. La présence des anticorps dans les sérums testés est une évidence sérologique de la présence de cet agent pathogène dans la plupart des troupeaux enquêtés. Or, 70,4 % des troupeaux possèdent au moins un animal séropositif. Les taux les plus élevés de prévalence ont été enregistrés au sud de la wilaya de Constantine plus précisément dans les communes d'Ain Abid (38,6 %) et Ain Smara (36 %), suivi des communes d'El Khroub (32,1 %) et Ouled Rahmoune (30,6 %).

Les facteurs de risque d'acquisition des infections à *Chlamydia* spp. définis par la présente étude sont le jeune âge (12 à 23 mois) et le non usage des désinfectants. L'étude a démontré une corrélation significative entre l'infection chlamydienne et les cas de mortinatalités et mortalités des jeunes agneaux. L'étude vient confirmer l'importance que jouent les services vétérinaires qui interviennent comme facteur protecteur contre l'infection par *C. abortus*.

L'avènement des techniques avancées de biologie moléculaire en particulier la PCR a permis d'aborder l'avortement sur le plan individuel. L'importance de *C. abortus* comme agent abortif a été investiguée par PCR-RFLP et séquençage d'ADN, extrait de tissus fœtaux d'avortons et d'agneaux mort-nés mais aussi de placentas de brebis avortées. Sur l'ensemble des 104 échantillons de tissus fœtaux et placentas testés, 26 prélèvements se sont révélés positifs pour le fragment du gène *omp2* spécifique aux *Chlamydiaceae*, soit un taux global de 25 % des échantillons révélés positifs par PCR (Ch1/Ch2). Tandis que 78 prélèvements ont donné des signaux négatifs. Sur les 8 placentas testés, 4 étaient *C. abortus* positifs.

L'étude moléculaire a permis d'élucider en partie la localisation de *C. abortus* dans les tissus fœtaux. L'ADN de *C. abortus* n'a pas été retrouvé dans les échantillons fœtaux d'estomac, contenu stomacal, liquide thoracique et liquide péritonéal. Parmi les 6 fœtus considérés positifs, l'ADN de *C. abortus* a été retrouvé dans le cerveau dans 83,3% des cas. L'acide nucléique recherché était également présent dans l'œil de 66,7% des fœtus PCR positifs. En outre, l'ADN recherché a été retrouvé dans d'autres tissus fœtaux : poumon, foie, rein, rate, cœur et intestin. Ce qui démontre une invasion bactérienne des viscères fœtaux par *C. abortus* en plus d'une placentite évoquée par l'analyse histologique qui serait à l'origine de l'expulsion prématurée des agneaux quelques semaines avant l'agnelage.

L'analyse de la séquence partielle du gène *omp2* et l'alignement avec les séquences nucléotidiques de GenBank a confirmé l'identité des isolats algériens appartenant à l'espèce *C. abortus*. La séquence nucléotidique partielle de similarité matrix du gène *omp2* montre que les isolats algériens possèdent 96 % de similarité avec la souche FAS de *C. abortus* et 84,3 % de similarité avec la souche *Chlamydia caviae* tandis qu'une similarité faible avec les autres espèces du genre *Chlamydia* a été enregistrée.

Malgré que la PCR-RFLP permette de diagnostiquer l'étiologie des avortements infectieux sur le plan individuel avec une très haute exactitude. Celle-ci peut ne pas être conclure sur l'origine de l'avortement dans le reste du troupeau. Il serait plus judicieux de combiner le diagnostic sérologique par ELISA sur un nombre représentatif de l'exploitation à la PCR. En effet, le dépistage sérologique demeure une méthode incontournable de diagnostic du profil sérologique des troupeaux à condition qu'il soit réalisé sur l'ensemble des femelles avortées et sur un échantillon de brebis ayant connu une mise bas normale en plus des males reproducteurs.

Il s'agit d'une étude sur terrain. Les principales difficultés rencontrées dans la collecte des échantillons est le refus d'une grande partie des éleveurs de s'impliquer en alertant l'investigateur de la survenue des cas d'avortements et de refuser carrément tout prélèvement de leurs troupeaux, attitude qui constitue par conséquent un réel handicap de limiter les meilleurs délais les sérieux dégâts que peut occasionner ces graves pathologies.

Par conséquent, des campagnes de sensibilisation s'imposent et doivent se multiplier notamment au près des éleveurs réticents qui doivent prendre conscience des réels dangers qui peuvent disséminer leurs troupeaux s'ils n'observent pas toutes les mesures de dépistage et de prévention qui sont instamment préconisées par les services de la direction des services agricoles

et du ministère de l'Agriculture, maintes fois alertés suite aux résultats probants de sérieuses recherches.

La détection précoce des agents infectieux abortifs est indispensable pour éliminer les animaux infectés, mettre en place très vite les mesures prophylactiques efficaces afin d'éviter une flambée d'avortements susceptible d'engendrer de lourdes pertes économiques dans l'élevage. Il est indispensable de sensibiliser les éleveurs, peut être au moyen de réunions d'information avec différents partenaires afin d'obtenir des déclarations d'avortements et de ne pas laisser ces maladies s'installer sans aucune investigation.

Par ailleurs, cette étude épidémiologique devrait être généralisée pour toute l'Algérie afin de pouvoir renseigner sur l'importance de cette maladie infectieuse, et d'implanter un système de surveillance et de contrôle de l'infection.

Il conviendrait de compléter ce travail par l'isolement de *C. abortus* à partir d'œufs embryonnés de poule et de produire un vaccin adéquat pour le contrôle de l'avortement enzootique des brebis et la protection du cheptel ovin en Algérie.

Références bibliographiques

1. **Abu-Dalbouh, M.A., Ababneh, M.M., Giadinis, N.D., Lafi, S.Q.** 2012
Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. *Tropical animal health and production* 44: 49-54.
2. **Aitken, I.D., Longbottom, D.** 2007
Chlamydial abortion. In: Aitken, I.D. (ed). Diseases of Sheep. Blackwell Publishing: 105-112.
3. **Aitken, I.D., Longbottom, D.** 2004
Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). In: OIE Biological Standards Commission (ed). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Office International des Epizooties, Paris: 635-641.
4. **Aitken, I.D.** 2000
Chlamydial abortion. In: Martin, W.B, Aitken, I.D. (eds). Diseases of Sheep. Blackwell science: 81-86.
5. **Aitken, I.D.** 1986
Chlamydial abortion in ewes. *In practice* 8: 236-237.
6. **Al-Qudah, K.M., Sharif, L.A., Raouf, R.Y., Hailat, N.Q., AL-Domy, F.M.** 2004
Seroprevalence of antibodies to *Chlamydia abortus* shown in awassi sheep and local goats in Jordan. *Veterinarni Medicina* 49: 460-466.
7. **Alton, G.G, Jones, L.M, Angus, R.D, Verger, J.M.** 1988
Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
8. **Amin, J.D, Wilsmore, A.J.** 1995
Studies on the early phase of the pathogenesis of ovine enzootic abortion in the nonpregnant ewe. *British Veterinary Journal* 151:141-154.
9. **Andersen, A.A.** 2004
Chlamydiosis. In: Infectious diseases of Livestock, Vol.1. Oxford: Oxford university press: 550-564.
10. **Anderson, I.E., Baxter, S.I., Dunbar, S., Rae, A.G., Philips, H.L., Clarkson, M.J., Herring, A.J.** 1996
Analyses of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 245-251.
11. **Anderson, I.E., Herring, A.J., Jones, G.E., Low, J.C., Greig, A.** 1995
Development and evaluation of an indirect ELISA to detect antibodies to abortion strains of *Chlamydia psittaci* in sheep sera. *Veterinary Microbiology* 43: 1-12.
12. **Andreani, E., Poli, A., Tolari, F., Cerri, D., Farina, R., Bandecchi, P.** 1987
Experimental infection of sheep with *Chlamydia psittaci*. *British Veterinary Journal* 143: 221-225.
13. **Andre, J.P.** 1994
La chlamydie aviaire à *Chlamydia psittaci* chez les oiseaux de cage: revue bibliographique. *Revue de Médecine Vétérinaire* 145 (12) : 915-929.
14. **Appleyard, W.T., Aitken, I.D., Anderson, I.E.** 1985
Attempted venereal transmission of *Chlamydia psittaci* in sheep. *Veterinary Record* 116 : 535-538.
15. **Arquie, M.** 2006
Investigation des causes abortive dans trios élevages ovins laitiers du bassin de Roquefort. Thèse d'exercice : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. 121 pages.

16. **Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A.** 2005
Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?
Veterinary Research 36: 327-349.
17. **Bacha, W.J., Bacha, L.M.** 2012
Color Atlas of Veterinary Histology. 3^e Ed: Wiley-Blackwell.
18. **Bagdonas, J., Petkevicius, S., Russo, P., Pepin, M., Salomskas, A.** 2007
Prevalence and epidemiological features of ovine enzootic abortion in Lithuania.
Polish Journal of Veterinary Sciences 10: 239-244.
19. **Baker, J.A.** 1944
A virus causing pneumonia in cats and producing elementary bodies.
Journal of Experimental Medicine 79: 159-172.
20. **Bártová, E., Sedlák, K., Literák, I.** 2009
Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* antibodies in sheep in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 161: 131-132.
21. **Bavoil, P., Ohlin, A., Schachter, J.** 1984
Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*.
Infection and Immunity 44: 479-485.
22. **Becerra, V.M., Ata, F.A., Storz, J.** 1976
Studies on the response of ewes to live Chlamydiae adapted to chicken embryos or tissue culture.
Canadian Journal of comparative Medicine 40: 46-52.
23. **Bedson, S.P., Western, G.T., Simpson, S., Levy, S.** 1930
Observations on the etiology of psittacosis.
Lancet 1: 235-236.
24. **Beer, R.J., Bradford, W.P., Hart, R.J.** 1982
Pregnancy complicated by psittacosis acquired from sheep.
British Medical Journal (Clinical Research Ed) 284: 1156-1157.
25. **Benhabyles, N., Benkirane, A., Boudilmi, B., Benchouk, S., Bouayoune, H.** 1992
Epidémiologie de la Brucellose humaine et animale dans les pays du Maghreb. In Plomm & M., ed. Prevention of Brucellosis in the mediterranean countries. Proc. Inter. Semin., Malta, 36-51.
26. **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.
27. **Benkirane, A., Jabli, N., Rodolakis, A.** 1990
Fréquence des avortements et séroprévalence des principales maladies infectieuses abortives dans la région de Rabat (Maroc).
Annales de Recherches Vétérinaires 21: 267-273.
28. **Bernard, J.G., Bereni J., Hainaut, J.** 1963
Aspect actuel des rickettsioses en Algérie.
Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 56 : 669-677.
29. **Bernkopf, H., Masiah, P., Becker, Y.** 1962
Correlation between morphological and biochemical changes and the appearance of infectivity in FL cell cultures infected with trachoma agent.
Annals of the New York Academy of Sciences 98: 62-81.

30. **Berri, M., Rekiki, A., Boumedine, K.S., Rodolakis, A.** 2009
Simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR.
BMC Microbiology 9: 130.
31. **Berri, M., Bernard, F., Lecu, A., Ollivet-Courtois, F., Rodolakis, A.** 2004
Molecular characterisation and ovine live vaccine 1B evaluation toward a *Chlamydophila abortus* strain isolated from springbok antelope abortion.
Veterinary Microbiology 103: 231-240.
32. **Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A.** 2002
Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock.
Veterinary Microbiology 85: 55-60.
33. **Bisias, G., Burriel, A., Boutsini, S., Kritas, S., Leontides, L.A.** 2011
Serological investigation of some abortion causes among small ruminant flocks in Greece.
The Internet Journal of Veterinary Medicine 8, 2.
34. **Blanchart, J.M.** 1994
La chlamydie féline.
Recueil de Médecine Vétérinaire 170 : 715-729.
35. **Borel, N., Doherr, M.G., Vretou, E., Psarrou, E., Thoma, R., Pospischil, A.** 2004
Seroprevalences for ovine enzootic abortion in Switzerland.
Preventive Veterinary Medicine 65: 205-216.
36. **Borel, N., Sachse, K., Rassbach, A., Bruckner, L., Vretou, E., Psarrou, E., Pospischil, A.** 2005
Ovine enzootic abortion (OEA): antibody response in vaccinated sheep compared to naturally infected sheep.
Veterinary Research Communications 29 (1): 151-156.
37. **Bostedt, H., Dedie', K.** 1996
Chlamydien abort. In: Bostedt, H. (Ed.), Schafkrankheiten, Eugen-Ulmer-Verlag, Stuttgart.
38. **Bouakane, A., Rekiki, A., Rodolakis, A.** 2005
Protection of pregnant mice against placental and splenic infection by tree strains of *Chlamydophila abortus* with a live 1B vaccine.
Veterinary Record 157: 771-774.
39. **Bouakane, A., Benchaïeb, I., Rodolakis, A.** 2003
Abortive potency of *Chlamydophila abortus* in pregnant mice is not directly correlated with placental and fetal colonization levels.
Infection and Immunity 71: 7219-7222.
40. **Bowen, R. A., Spears, P., Storz, J., Seidel, G. E.** 1978
Mechanisms of infertility in genital tract infections due to *Chlamydia psittaci* transmitted through contaminated semen.
Journal of Infectious Diseases 138:95-98.
41. **Brade, L., Rozalski, A., Kosma, P., Brade, H.** 2000
A monoclonal antibody recognizing the 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) trisaccharide α Kdo(2 \rightarrow 4) α Kdo(2 \rightarrow 4) α Kdo of *Chlamydophila psittaci* 6BC lipopolysaccharide.
Journal of Endotoxin Research. 6: 361-368.
42. **Brugère-Picoux, J.** 2011
Avortement enzootique. In: Editions France Agricole. Maladies infectieuses du mouton. GFA Editions : 25-30.
43. **Buendia, A.J., Cuello, F., Del Rio, L., Gallego, M.C., Caro, M.R., Salinas, J.** 2001
Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection.
Veterinary Microbiology 78: 229-239.

44. **Buendia, A.J., Montes de Oca, R., Navarro, J.A., Sanchez, J., Cuello, F., Salinas, J.** 1999
Role of polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion.
Infection and Immunity 67:2110-2116.
45. **Buendia, A.J., Salinas, J., Sanchez, J., Gallego, M.C., Rodolakis, A., Cuello, F.** 1997
Localization by immunoelectron microscopy of antigens of *Chlamydia psittaci* suitable for diagnosis and vaccine development.
FEMS Microbiology Letters 150: 113-119.
46. **Buxton, D., Anderson, I.E., Longbottom, D., Livingstone, M., Wattedgedera, S., Entrican, G.** 2002
Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues.
Journal of Comparative Pathology 127: 133-141.
47. **Buxton, D., Henderson, D.** 1999
Infectious abortion in sheep.
In practice 21: 360-368.
48. **Buxton, D., Barlow, R.M., Finlayson, J., Anderson, I.E., Mackellar, A.,** 1990
Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep.
Journal of Comparative Pathology 102: 221-237.
49. **Buxton, D.** 1986
Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep.
Veterinary Record 118: 510-511.
50. **Buzoni-Gatel, D., Rodolakis, A.** 1983
A mouse model to compare virulence of abortive and intestinal ovine strains of *Chlamydia psittaci*: influence of the route of inoculation.
Annals of Microbiology 134 A: 91-99.
51. **Caldwell, H.D., Judd, R.C.** 1982
Structural analysis of chlamydial major outer membrane proteins.
Infection and Immunity 38: 960-968.
52. **Carneiro, A.C., Carneiro, M., Gouveia, A.M., Guimaraes, A.S., Marques, A.P., Vilas-Boas, L.S., Vitor, R.W.** 2009
Seroprevalence and risk factors of caprine toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil.
Veterinary Parasitology 160: 225-229.
53. **Caro, M.R., Buendia, A.J., Del Rio, L., Ortega, N., Gallego, M.C., Cuello, F., Navarro, J.A., Sanchez, J., Salinas, J.** 2009
Chlamydophila abortus infection in the mouse: a useful model of the ovine disease.
Veterinary Microbiology 135: 103-111.
54. **Capuano, F., Parisi, A., Cafiero, M.A., Pitaro, L., Fenizia, D.** 2004
Coxiella burnetii: what is the reality?
Parassitologia, 46:131-1340.
55. **Chanton-Greutmann H., Thoma R., Corboz L., Borel N. & Pospischil A.** 2002
Abortion in small ruminants in Switzerland: Investigations during two lambing seasons (1996-1998) with special regard to chlamydial abortions.
Schweizer Archiv für Tierheilkunde. 144(9):483-492.
56. **Cevenini, R., Donati, M., Brocchi, E., De Simone, F., La Placa, M.** 1991
Partial characterization of an 89-kDa highly immunoreactive protein from *Chlamydia psittaci* A/22 causing ovine abortion.
FEMS Microbiology Letters 65: 111-115.

57. **Châarani, B.** 1987
Management and productivity of sheep flocks in Mekrres province (Morocco), with special reference to abortion and lamb mortality. Thèse de doctorat sciences agronomiques : université Minnesota. 294 pages.
58. **Chadli, A.** 1983
La brucellose en Tunisie: Historique et données actuelles.
Les Archives de l'Institut Pasteur de Tunis 60 : 305 -324.
59. **Chalmers, W.S., Simpson, J., Lee, S.J., Baxendale, W.** 1997
Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion.
Veterinary Record 141: 63-67.
60. **Chalmers, G.A., Klavano, G.G., Nagge, W.T., Christian, R.G.** 1976
Ovine Chlamydial abortion in Alberta.
Canadian Veterinary Journal 17: 76-81.
61. **Chartier, C., Chartier, F.** 1988
Enquête séroépidémiologique sur les avortements infectieux des petits ruminants en Mauritanie. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 41: 23-34.
62. **Chiappino, M.L., Dawson, C., Schachter, J., Nichols, B.A.** 1995
Cytochemical localization of glycogen in *Chlamydia trachomatis* inclusions.
Journal of Bacteriology 177: 5358-5363.
63. **Čisláková, L., Halanova, M., Kovacova, D., Stefancikova, A.** 2007
Occurrence of antibodies against *Chlamydia abortus* in sheep and goats in the Slovak Republic.
Annals of Agricultural and Environmental Medicine 14: 243-245.
64. **Clarkson, M.J., Philips, H.L.** 1997
Isolation of faecal chlamydia from sheep in Britain and their characterization by cultural properties.
The Veterinary Journal 153: 307-310.
65. **Corsaro, D., Greub, G.** 2006
Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria.
Clinical Microbiological Reviews 19: 283-297.
66. **Cowley, R., Fernandez, F., Freemantle, W., Rutter, D.** 1992
Enzyme immunoassay for Q fever: comparison with complement fixation and immunofluorescence tests and dot immunoblotting.
Journal of Clinical Microbiology 30: 2451-2455.
67. **Crosse, B.A., Gomes, P., Muers, M.M.** 1971
Ovine psittacosis and sarcoidosis in a pregnant woman.
The New England Journal of Medicine 284: 642-653.
68. **Czopowicz, M., Kabaa, J., Szalù-Jordanowb, O., Nowickia, M., Witkowskia, L., Frymusb, T.** 2011.
Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland.
Veterinary Parasitology 178: 339-341.
69. **Czopowicz, M., Kaba, J., Szalus-Jordanow, O., Nowicki, M., Witkowski, L., Nowicka, D., Frymus, T.** 2010.
Prevalence of antibodies against *Chlamydia abortus* and *Coxiella burnetii* in goat herds in Poland.
Polish Journal of Veterinary Sciences 13: 175-179.
70. **da Silva Andrade, G., Bruhn, F.R., Rocha, C.M., Guimaraes Ade, S., Gouveia, A.M., Guimaraes, A.M.** 2012
Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in sheep in the state Minas Gerais, southeastern Brazil.
Veterinary Parasitology 188: 168-171.

71. **Davies, R.H., Dalziel, R., Gibbens, J.C., Wilesmith, J.W., Ryan, J.M., Evans, S.J., Byrne, C., Paiba, G.A., Pascoe, S.J., Teale, C.J.** 2004
National survey for Salmonella in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000).
Journal of Applied Microbiology 96: 750-760.
72. **Dawson, M., Zaghoul, A., Wilsmore, A.J.** 1986
Ovine enzootic abortion: experimental studies of immune responses.
Research in Veterinary Sciences 40: 59-64.
73. **de Barbeyrac B., Bebear C., Dupon M.** 1997
Infections à *Chlamydia*.
Traité EMC Maladies infectieuses: 8-037-A-10. Elsevier Masson SAS, Paris.
74. **Demkin, V.V., Zimin, A.L.** 2005
A new amplification target for PCR-RFLP detection and identification of Chlamydiaceae species.
Archives of Microbiology 183: 169-175.
75. **Denamur, E., Sayada, C., Souriau, A., Orfila, J., Rodolakis, A., Elion, J.** 1991
Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*.
Journal of General Microbiology 137: 2525-2530.
76. **De Sa, C.** 1996
La protéine majeure de la membrane externe de *Chlamydia* : structure et fonctions.
Veterinary Research 27: 317-331.
77. **Diakoua, A., Papadopoulos, E., Panousis, N., Karatzias, C., Giadinis, N.** 2013
Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming.
Veterinary Parasitology 198: 387-390.
78. **Di Francesco, A., Baldelli, R.** 2002
Feline chlamydiosis in Italy: PCR amplification and analysis of the ompA and groEL-homolog genes.
New Microbiologica 25: 341-344.
79. **Donn, A., Jones, G.E., Ruiu, A., Ladu, M., Machell, J., Stancanelli, A.** 1997
Serological diagnosis of chlamydial abortion in sheep and goats: comparison of the complement fixation test and an enzyme-linked immunosorbent assay employing solubilised proteins as antigen.
Veterinary Microbiology 59: 27-36.
80. **Dordain-Bouesnard, C.** 2001
Revue bibliographique et contribution à l'étude épidémiologique de la fièvre Q en région Rhône Alpes. Veterinary thesis N° 21. Lyon Veterinary School, France.
81. **Dubey, J.P.** 2003
Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals.
Korean Journal of Parasitology 41: 1-16.
82. **Dubey, J.P., Hartley, W.J., Lindsay, D.S., Topper, M.J.** 1990
Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb.
Journal of Parasitology 76: 127-130.
83. **Dubreuil, P., Arsenault, J.** 2003
Les avortements chez les petits ruminants.
Le Médecin Vétérinaire du Québec 33: 6-9.
84. **Dufour, B., Moutou, F., Rodolakis, A.** 1997
Méthode d'échantillonnage et de prélèvement. In: Nettleton, P., Rodolakis, A. (eds). Manuel pratique de diagnostic de laboratoire des avortements infectieux des petits ruminants. L'espace Vétérinaire Éditeurs, Casablanca, Maroc.

85. **Duquesnel, R.** 1997
La fièvre Q: Statut sanitaire et risque pour l'homme.
Dépêche Vétérinaire 55: 31-34.
86. **Durand, M.** 1977
Diagnostic des chlamydioses des ruminants : valeur de la fixation du complément.
Recueil de Médecine Vétérinaire 153 (9): 585-593.
87. **EBI**, 2010
EBI2Can, Karyn's Genomes, Bacteria genomes *Chlamydomonas abortus*. Site disponible sur :
http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/bacteria/Chlamydomonas_abortus.html. (Page consulté le 23.12.2010).
88. **Eissenberg, L.G., Wyrick, P.B.** 1981
Inhibition of phagolysosome fusion is located to *Chlamydia psittaci*-laden vacuoles.
Infection and Immunity 32: 880-96.
89. **Enright, F.M., Walker, J.V., Jeffers, G., Deyoe, B.L.** 1984
Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses.
American Journal of Veterinary Research 45: 424-430.
90. **Entrican, G., Wattegedera, S., Wheelhouse, N., Allan, A., Rocchi, M.** 2010
Immunological paradigms and the pathogenesis of ovine chlamydial abortion.
American Journal of Reproductive Immunology 64: 287-294.
91. **Entrican, G.** 2002
Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of Comparative Pathology* 126: 79-94.
92. **Entrican, G., Buxton, D., Longbottom, D.** 2001
Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology.
Journal of the Royal Society of Medicine 94: 273-277.
93. **Entrican, G., Brown, J., Graham, S.** 1998
Cytokines and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*.
Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 21: 15-26.
94. **Everett, K.D.** 2000
Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye.
Veterinary microbiology 75: 109-126.
95. **Everett, K.D.E., Andersen, A.A.** 1999
Identification of nine species of the *Chlamydiaceae* using PCR-RFLP.
International Journal of Systematic Bacteriology 49: 803-813.
96. **Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A.** 1999
Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms.
International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 415-440.
97. **Everett, K.D., Andersen, A.A.**, 1997
The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp.
International Journal of Systematic Bacteriology 47: 461-473.
98. **Faye, P., Charton, A., Mage, C., Bernard, C., Le Layec, C.** 1972
Propriétés hémagglutinantes du « virus » de l'avortement enzootique des petits ruminants (souches de *Rickettsia* d'origine ovine et caprine).
Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 45 : 169-173.

99. **Field, P.R., Hunt, J.G., Murphy, A.M.** 1983
Detection and persistence of specific IgM antibody to *Coxiella burnetii* by enzyme-linked immunosorbent assay: A comparison with immunofluorescence and complement fixation tests.
Journal of Infectious Diseases 148:477-487.
100. **Figliuolo, L.P.C., Kasai, N., Ragozo, A.M.A., de Paula, V.S.O., Dias, R.A., Souza, S.L.P., Gennari, S.M.** 2004a
Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil.
Veterinary Parasitology 123: 161-166.
101. **Figliuolo, L.P.C., Rodrigues, A.A.R., Viana, R.B., Aguiar, D.M., Kasai, N., Gennari, S.M.** 2004b
Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil.
Small Ruminant Research 55: 29-32.
102. **Flandrois, J-P.** 2000
Bactériologie médicale. Collection Azay. Presses universitaires de Lyon (Ed). 309 pages.
103. **Fuensalida-Draper E., Rodolakis, A.** 1978
Kinetics of the complement fixing and immunofluorescent antibody response in experimental chlamydiosis in ewes.
Annales de recherches vétérinaires 9 (3): 505-516.
104. **Fukushi, H., Hirai, K.** 1993
Chlamydia pecorum--the fourth species of genus Chlamydia.
Microbiology and Immunology 37: 516-522.
105. **Fukushi, H., Hirai, K.** 1992
Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for Chlamydia strains derived from ruminants. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 306-308.
106. **Gerber, A., Thoma, R., Vretou, E., Psarrou, E., Kaiser, C., Doherr, M.G., Zimmermann, D.R., Polkinghorne, A., Pospischil, A., Borel, N.** 2007
Ovine Enzootic Abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected swiss sheep over a two year period.
BMC Veterinary Research 3: 24.
107. **Ghalmi, F., China, B., Kaidi, R., Losson, B.** 2011
Nesopora caninum is associated with abortion in Algerian cattle.
Journal of Parasitology 97 (6): 1121-1124.
108. **Giroud, P., Roger, F., Dumas, N.** 1956
Certain abortions in women could be attributed to agents belonging to the psittacosis group.
Les Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences 242 : 697-699.
109. **Goellner, S., Schubert, E., Liebler-Tenorio, E., Hotzel, H., Saluz, H.P., Sachse, K.** 2006
Transcriptional response patterns of *Chlamydia psittaci* in different in vitro models of persistent infection.
Infection and Immunity 74: 4801-4808.
110. **Gokce, H.I., Kacar, C., Genc, O., Sozmen, M.** 2007
Seroprevalence of *Chlamydia abortus* in aborting ewes and dairy cattle in the north-east part of Turkey.
Bulletin of the veterinary institute in Pulawy 51: 9-13.
111. **Gonnert, R.** 1941
Die Bronchopneumonie, eine neue Viruskrankeheit der Mans.
Zentralbl Bakt (OrigA) 147:161-174.
112. **Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T.** 2013
A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present.
Infection, Genetics and Evolution 13: 133-150.

113. **Gordon, F.B., Quan, A.L.** 1965a
Isolation of the Trachoma Agent in Cell Culture.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 118: 354-359.
114. **Gordon, F.B., Quan, A.L.** 1965b
Occurrence of Glycogen in Inclusions of the Psittacosis-Lymphogranuloma Venereum-Trachoma Agents.
Journal of Infectious Diseases 115: 186-196.
115. **Grayston, J.T., Wang, S.P., Kuo, C.C., Campbell, L.A.** 1989
Current knowledge on Chlamydia pneumoniae, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 8: 191-202.
116. **Greig, J.R.** 1936
Enzootic abortion in ewes; a preliminary note.
Veterinary Record 42: 1225-1227
117. **Griffiths, P.C., Plater J.M., Horigan, M.W., Rose, M.P., Venables, C., Dawson, M.** 1996
Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by comparative inclusion immune- fluorescence assay, recombinant lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay, and complement fixation test.
Journal of Clinical Microbiology 34: 1512-1518.
118. **Guerin, D.** 2004
Les avortements ovins que faire pour améliorer leur contrôle? GDS Creuse. Site disponible sur :http://cluster006.ovh.net/~gdscreus/wp-content/uploads/2012/01/08_8-Avortements-ovins.pdf. Page consultée le 13.06.2014.
119. **Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E.I., and Fischer, E.R.** 1999
The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion.
Cellular Microbiology 1: 119-30.
120. **Hackstadt, T., Todd, W.J., Caldwell, H.D.** 1985
Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae?
Journal of Bacteriology 161: 25-31.
121. **Hadley, K.M., Carrington, D., Frew, C.E., Gibson, A.A., Hislop, W.S.** 1992
Ovine chlamydiosis in an abattoir worker.
Journal of Infection 25: 105-109.
122. **Halberstaedter, L. von Prowazek, S.** 1907
Zur aetiologie des Trachoms.
Deutsche Medizinische Wochenschrift 33: 1285-1287.
123. **Hamzy-El Idrissi, A., Manyari, A., Benkirane, A.** 1995
Fréquence des avortements infectieux des ovins au Maroc (régions des Zaer et du Moyen Atlas).
Actes de l'Institut Agronomique Vétérinaire 15 (4): 11-14.
124. **Hartley, J.C., Kaye, S., Stevenson, S., Bennett, J., Ridgway, G.** 2001
PCR detection and molecular identification of Chlamydiaceae species.
Journal of Clinical Microbiology 39: 3072-3079.
125. **Hassig, M., Sager, H., Reitt, K., Ziegler, D., Strabel, D., Gottstein, B.** 2003
Neospora caninum in sheep: a herd case report.
Veterinary Parasitology 117 (3): 213-220.
126. **Hatch, T.P.** 1999
Developmental Biology. In: RS Stephens (ed). Chlamydia; Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. American Society of Microbiology, Washington, DC: 29-67.

127. **Hellenbrand, W., Breuer, T., Petersen, L.** 2001
Changing Epidemiology of Q Fever in Germany, 1947-1999.
Emerging Infectious Diseases 7:789-796.
128. **Hilbert, A., Schmoock, G., Lenzko, H., Moog, U., Diller, R., Fröhlich, A., Hoffmann, L., Horner, S., Elschner, M., Tomaso, H., Henning, K., Neubauer, H., Sprague, L.D.** 2012
Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy German Sheep flocks.
BMC Research Notes 5:152.
129. **Hodinka, R.L., Wyrick, P.B.** 1986
Ultrastructural study of mode of entry of Chlamydia psittaci into L-929 cells.
Infection and Immunity 54: 855-863.
130. **Hoelzle, L.E., Hoelzle, K., Wittenbrink, M.M.** 2004
Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera.
Veterinary Microbiology 103: 85-90.
131. **Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., Timms, P.** 2004
Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm.
Infection and Immunity 72: 1843-1855.
132. **Hosmer, D., Lemeshow, S.** 2000
Applied Logistic Regression. Wiley-Blackwell.
133. **Houe, H., Baker, J.C., Maes, R.K., Lloyd, J.W., Enevoldsen, C.** 1995
Comparison of the prevalence and incidence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in Denmark and Michigan and association with possible risk factors.
Acta Veterinaria Scandinavica 36: 521-531.
134. **Houwens, D.J., De Jong, D.** 1986
Direct detection and cell culture isolation of bovine chlamydia. In: Aitken, I.D. (Ed). Chlamydial diseases of ruminants. Commission of the European Communities, Luxembourg: 45-49.
135. **Hyde, S.R., Benirschke, K.** 1997
Gestational psittacosis: case report and literature review.
Modern Pathology 10: 602-607.
136. **Innis, M.A., Gelfand, D.H.** 1990
PCR protocols. Academic press, San Diego.
137. **Johnson, F.W.A., Clarkson, M.J., Spencer, W.N.** 1983
Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (*Chlamydia psittaci*) in cell cultures.
Veterinary Record 113: 413-414.
138. **Jones, G.E., Low, J.C., Machell, J., Armstrong, K.** 1997
Comparison of five tests for the detection of antibodies against Chlamydia l (enzootic) abortion of ewes.
Veterinary Record 141: 164-168.
139. **Jones, G.E.** 1995
Chlamydia psittaci: prevailing problems in pathogenesis.
British Veterinary Journal 151: 115-118.
140. **Jones, G.E., Anderson, I.E.** 1989
Chlamydia psittaci excretion in ovine milk tested.
Veterinary Record 124: 562.
141. **Jones, G.E., Anderson, I.E.** 1988
Chlamydia psittaci: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion?
Research in Veterinary Sciences 44: 260-261.

142. **Jungas, T.** 2005
Etude de la mort cellulaire induite par la bactérie intracellulaire stricte, Chlamydia. Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes : Ecole Pratique Des Hautes Etudes, Sciences de la Vie et de la Terre. 18 pages.
143. **Kadra B., Balla, E.** 2006
Development and production of vaccines against abortion caused by *Chlamydomphila abortus* and *Coxiella burnetii* in small ruminants.
Small Ruminant Research 62: 75-78.
144. **Kaltenboeck, B., Heard, D., Degraives, F.J., Schmeer, N.** 1997
Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-Linked Immunosorbent Assay of antibodies against abortigenic chlamydia psittaci in ruminants.
Journal of Clinical Microbiology 35: 2293-2298.
145. **Kampinga, G.A., Schroder, F.P., Visser, I.J., Anderson, J.M., Buxton, D., Moller, A.V.** 2000
Lambing ewes as a source of severe psittacosis in a pregnant woman.
Nederlands tijdschrift voor geneeskunde 144: 2500-2504.
146. **Kerr, K., Entrican, G., McKeever, D., Longbottom, D.** 2005
Immunopathology of *Chlamydomphila abortus* infection in sheep and mice.
Research in Veterinary Science 78: 1-7.
147. **Khammassi-Khabou M., Hammami S., Cherif A., Majok A.** 2009
Séroprévalence des majeures maladies infectieuses causant l'avortement chez les petits ruminants. Durabilité des systèmes d'élevage des petits ruminants en Tunisie: Une approche de santé animale et marketing.
International Livestock Research Institute 17: 5-24.
148. **Khaschabi, D., Brandstätter, A.** 1994
Seroepidemiologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen *Coxiella burnetii* und *Chlamydia psittaci* bei Schafen in Tirol.
Wiener Tierärztliche Monatsschrift 81: 290-294.
149. **Kilic, S., Pasa, S., Babur, C., Özlem, MB.** 2005
Investigation of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep in Aydin region, Turkey.
Revue de Médecine Vétérinaire 156:336-340.
150. **Kennerman, E., Rousset, E., Gölcü, E., Dufour, P.** 2010
Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey.
Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 33:37-45.
151. **Kirkbride, C.A.** 1993
Diagnoses in 1,784 ovine abortions and stillbirths.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 5: 398-402.
152. **Kobayashi, Y., Yamada, M., Omata, Y., Koyama, T., Saito, A., Matsuda, T., Okuyama, K., Fujimoto, S., Furuoka, H., Matsui, T.** 2001
Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses.
Journal of Parasitology 87 (2): 434-436.
153. **Kovacova, E., Kazar, J., Spanelova, D.** 1998
Suitability of various *Coxiella burnetii* antigen preparations for detection of serum antibodies by various tests.
Acta Virologica 42: 365-368.
154. **Koyama, T., Kobayashi, Y., Omata, Y., Yamada, M., Furuoka, H., Maeda, R., Matsui, T., Saito, A., Mikami, T.** 2001
Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep.
Journal of Parasitology 87 (6): 1486-1488.

155. **Lange, S., Söllner, H., Dittmar, H., Hofmann, J., Lange, A.** 1992
Q fever antibody titre follow-up study in cattle with special reference to pregnancy.
Berl Munch Tierarztl Wochenschr 105: 260-263.
156. **Larson, R.L., Hardin, D.K., Pierce, V.L.** 2004
Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle.
Journal of the American Veterinary Medical Association 224: 1597-1604.
157. **Leaver, H.A., Howie, A., Aitken, I.D., Appleyard, B.W., Anderson, I.E., Jones, G.E., Hay, L.A., Williams, G.E., Buxton, D.** 1989
Changes in progesterone, oestradiol 17b and intrauterine prostaglandin E2 during late gestation in sheep experimentally infected with an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*.
Journal of General Microbiology 135: 565-573.
158. **Leite-Browning, M.** 2006
Causes of Infectious Abortions in Goats. ACES publications. Site disponible sur
<http://www.aces.edu/pubs/docs/U/UNP-0079/>. Page consultée le 31/10/2011.
159. **Lenoble, S.** 2002
Etude des maladies abortives chez les Ongulés sauvages. Lyon : Université Claude Bernard,
DEA Analyse et model. Syst. Biol., 30 pages.
160. **Lenzko, H., Moog, U., Henning, K., Lederbach, R., Diller, R., Menge, C., Sachse, K., Sprague, L.D.** 2011
High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks.
BMC Veterinary Research 7: 29.
161. **Letaief, A.O., Yacoub, S., Dupont, H.T., Le Cam, C., Ghachem, L., Jemni, L., Raoult, D.** 1995
Seroepidemiological survey of rickettsial infections among blood donors in central Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 266-268.
162. **Lipkin, E.S., Moncada, J.V., Shafer, M.A., Wilson, T.E., Schachter, J.** 1986
Comparison of monoclonal antibody staining and culture in diagnosing cervical chlamydial infection.
Journal of Clinical Microbiology 22:114-117.
163. **Livingstone, M., Wheelhouse, N., Maley, S.W., Longbottom, D.** 2009
Molecular detection of *Chlamydophila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing.
Veterinary Microbiology 135: 134-141.
164. **Loison, A.** 1995
Approches intra et inter-spécifiques de la dynamique des populations : l'exemple du chamois. Thèse de doctorat:
Université Claude Bernard, Lyon : 311 pages.
165. **Longbottom, D., Entrican, G., Wheelhouse, N., Brough, H., Milne, C.** 2013
Evaluation of the impact and control of enzootic abortion of ewes.
Veterinary Journal 195: 257-259.
166. **Longbottom, D., Coulter, L.J.** 2003
Animal chlamydioses and zoonotic implications.
Journal of comparative pathology 128: 217-244.
167. **Longbottom, D., Fairley, S., Chapman, S., Psarrou, E., Vretou, E., Livingstone, M.** 2002
Serological Diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*.
Journal of Clinical Microbiology 40(11): 4235-4243.
168. **Longbottom, D., Psarrou, E., Livingstone, M., Vretou, E.** 2001
Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*.
FEMS Microbiology Letters 195 (2): 157-161.

169. **Longbottom, D., Russell, M., Dunbar, S.M., Jones, G.E., Herring, A.J.** 1998
Molecular cloning and characterization of the genes coding for the highly immunogenic cluster of 90-kilodalton envelope proteins from the *Chlamydia psittaci* subtype that causes abortion in sheep.
Infection and Immunity 66:1317-1324.
170. **Lukacova, M. Melnicakova, J., Kazar, J.** 1999
Cross reactivity between *Coxiella burnetii* and *Chlamydiae*.
Folia Microbiologica 44 (5): 579-584.
171. **Madico, G., Quinn, T.C., Boman, J., Gaydos, C.A.** 2000
Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes.
Journal of Clinical Microbiology 38: 1085-1093.
172. **Mainar-Jaime, R.C., De La Cruz, C., Vázquez-Boland, J.A.** 1998
Epidemiological study of chlamydial infection in sheep farms in Madrid, Spain.
Small Ruminant Research 28, 131-138.
173. **Maley, S.W., Livingstone, M., Rodger, S. M., Longbottom, D., Buxton, D.** 2009
Identification of *Chlamydophila abortus* and the development of lesions in placental tissues of experimentally infected sheep.
Veterinary Microbiology 135: 122-127
174. **Malot, N., Bru, C., Turquand, O.** 1981
Statistiques départementales d'avortements infectieux non brucelliques caprins.
Bulletin des G.T.V., Paris, 3 Bis-C-046.
175. **Mani, B.K., Mini, M., Vasudevan, V.N.** 2011
Protein profile of *Chlamydophila abortus* isolates from Kerala, India.
Veterinary World 4 (10): 470-472.
176. **Markey, B.K., McNulty, M.S., Todd, D.** 1993
Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. *Veterinary Microbiology* 36: 233-252.
177. **Marsilio, F., Di Martino, B., Di Francesco, C.E., Meridiani, I.** 2005
Diagnosis of ovine chlamydial abortions by PCR-RFLP performed on vaginal swabs.
Veterinary Research Communications 29 (1), 99-106.
178. **Martin, W.B.** 2000
Diseases of Sheep. 3^e ed. London: Blackwell Science.
179. **Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P.** 1987
Veterinary epidemiology, principles and methods. 1^{ère} ed. Iowa State University Press, Ames: 32-38.
180. **Masala, G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, G., Patta, C., Tola, S.** 2007
Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 19: 96-98.
181. **Masala, G., Porcu, R., Sanna, G., Tanda, A., Tola, S.** 2005
Role of *Chlamydophila abortus* in ovine and caprine abortion in Sardinia, Italy.
Veterinary Research Communications 29 (1), 117-123.
182. **Maurin, M., Raoult, D.** 1999
Q fever.
Clinical Microbiology Reviews 12(4): 518-553.
183. **McEwen, A.D., Stamp, J.T., Littlejohn, A.I.** 1951
Enzootic abortion in ewes. II. Immunization and infection experiments.
Veterinary Record 63 (11): 197-201

184. **McNutt, S.H., Waller, E.F.** 1940
Sporadic bovine encephalomyelitis.
Cornell Veterinarian 30: 437-448.
185. **McQuiston, J.H., Childs, J.E.** 2002
Q fever in humans and animals in the United States.
Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2: 179-191.
186. **Meadows, S., Menzies, P., Jones Bitton, A., Mcewen, S. and Jansen, J.** 2012
Prevalence of *Coxiella burnetii* infection (Q fever) in sheep flocks and goat herds in Ontario, Canada and their farm workers with associated risk factors. Poster 32. ISVEE. Book of Abstracts.
187. **Meijer, A., Kwakkel, G.J., De Viries, A., Schouls, L.M., Ossewaarde, J.M.** 1997
Species identification of Chlamydia Isolates by Analyzing Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S-23S rRNA Spacer Region.
Journal of Clinical Microbiology 35: 1179-1183.
188. **Michalopolou, E., Leigh, A.J., Cordoba, L.G.** 2007
Detection of the genome of *Chlamydophila abortus* in samples taken from the uteri of 304 sheep at an abattoir.
Veterinary Record 161: 153-155.
189. **Miller, M.A., Turk, J.R., Nelson, S.L., Van Der Lek, A.P., Solorzano, R., Fales, W.H., Morehouse, L.G., Gosser, H.S.** 1990
Chlamydial infection in aborted and stillborn lambs.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2: 55-58.
190. **Milne, C.E., Gunn, G.J., Entrican, G., Longbottom, D.** 2009
Epidemiological modeling of chlamydial abortion in sheep flocks.
Veterinary Microbiology 135: 128-133.
191. **Miyagawa, Y., Mitamura, T., Yaoi, H., Ishii, N., Nakajima, H., Okanishi, J., Watanabe, S., Sato, K.** 1935a
Studies on the virus of lymphogranuloma inguinale Nicolas, Faure and Durand. First report.
Japanese Journal of Experimental Medicine 13: 1-18.
192. **Miyagawa, Y., Mitamura, T., Yaoi, H., Ishii, N., Okanishi, J.** 1935b
Studies on the virus of lymphogranuloma inguinale Nicolas, Faure and Durand. Second report. Experimental findings in mouse infection.
Japanese Journal of Experimental Medicine 13: 331-339.
193. **Miyagawa, Y., Mitamura, T., Yaoi, H., Ishii, N., Okanishi, J.** 1935c
Studies on the virus of lymphogranuloma inguinale Nicolas, Faure and Durand. Third report. Studies on filtration, especially ultrafiltration of the virus.
Japanese Journal of Experimental Medicine 13: 723-731.
194. **Miyagawa, Y., Mitamura, T., Yaoi, H., Ishii, N., Okanishi, J.** 1935d
Studies on the virus of lymphogranuloma inguinale Nicolas, Faure and Durand. Fourth report. Cultivation of the virus on the chorioallantoic membrane of the chicken embryo.
Japanese Journal of Experimental Medicine 13: 733-750.
195. **Moore, D.P.** 2005
Neosporosis in South America.
Veterinary Parasitology 127 (2): 87-97.
196. **Morange, A.** 1895.
De la psittacose ou infection spéciale déterminée par les perruches. Thèse de Paris. 77 pages.
197. **Moulder, J.W.** 1982
The relation of basic biology to pathogenic potential in the genus *Chlamydia*.
Infection 10 (1) : S10-18.

198. **Moulder, J.W.** 1966
The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses.
Annual Review of Microbiology 20 : 107-130.
199. **Muñoz, P.M., Marin, C.M., Monreal, D., Gonzalez, D., Garin-Bastuji, B., Diaz, R., Mainar Jaime, R.C., Moriyon, I., 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 (1): 141-151.
200. **Navarro, J.A., Garcia de la Fuente, J.N., Sanchez, J., Martinez, C.M., Buendia, A.J., Gutierrez-Martin, C.B., Rodriguez-Ferri, E.F., Ortega, N., Salinas, J.** 2004
Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydophila abortus* in experimentally infected pregnant ewes.
Veterinary Pathology 41: 498-505.
201. **Nielsen, K.** 2002
Diagnosis of brucellosis by serology.
Veterinary Microbiology 90: 447-459.
202. **Nietfeld, J.C.** 2001.
Chlamydial infections in small ruminants.
The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice 17 (2): 301-314, vi.
203. **Nurminen, M., Rietschel, E.T., and Brade, H.** 1985
Chemical characterization of *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide.
Infection and Immunity 48: 573-575.
204. **Ongör, H., Cetinkaya, B., Acik, M. N., Karahan, M., Bulut, H.** 2004
Detection of *Chlamydophila abortus* in Ovine Milk by Immunomagnetic Separation-Polymerase Chain Reaction.
Journal of Veterinary Medicine 51: 43-45.
205. **Osman, K.M., Ali, H.A., ElJakee, J.A., Galal, H.M.** 2011
Chlamydophila psittaci and *Chlamydophila pecorum* infections in goats and sheep in Egypt.
Revue Scientifique et Technique 30: 939-948.
206. **Ossewaarde, J.M., Meijer, A.** 1999
Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. *Microbiology* 145 (Pt 2): 411-417.
207. **Page, L.A.** 1968
Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia*. Jones, Rake, and Stearns 1945.
International Journal of Systematic Bacteriology 18: 51-56.
208. **Page, L.A.** 1966
Interspecies transfer of psittacosis-LGV-trachoma agents: pathogenicity of two avian and two mammalian strains for eight species of birds and mammals.
American Journal of Veterinary Research 27: 397-407.
209. **Panadero, R., Paineira, A., López, C., Vázquez, L., Paz, A., Díaz, P., Dacal, V., Cienfuegos, S., Fernández, G., Lago, N., Díez-Baños, P., Morrondo, P.** 2010
Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain).
Research in Veterinary Science 88: 111-115.
210. **Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K.** 2009
New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples.
Veterinary Journal 181: 145-150.

211. **Papp, J.R., Shewen, P.E., Thorn, C.E., Andersen, A.A.** 1998
Immunocytologic detection of *Chlamydia psittaci* from cervical and vaginal samples of chronically infected ewes.
Canadian Journal of Veterinary Research 62: 72-74.
212. **Papp, J.R., Shewen, P.E.** 1997
Chlamydia psittaci infection in sheep: a paradigm for human reproductive tract infection.
Journal of Reproductive Immunology 34: 185-202.
213. **Papp, J.R., Shewen, P.E.** 1996a
Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding.
Infection and Immunity 64: 1116-1125.
214. **Papp, J.R., Shewen, P.E.** 1996b
Localization of chronic *Chlamydia psittaci* infection in the reproductive tract of sheep.
Journal of Infectious Diseases 174: 1296-1302.
215. **Papp, J.R., Shewen, P.E., Gartley, C.J.** 1994
Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep during estrus.
Infection and Immunity 62: 3786-3792.
216. **Papp, J.R., Shewen, P.E., Gartley, C.J.** 1993
Chlamydia psittaci infection and associated infertility in sheep.
Canadian Journal of Veterinary Research 57: 185-189.
217. **Pardon P., Sanchis R., Marly J., Lantier F., Guilloteau L., Buzonigatel D., Oswald I. P., Pepin M., Kaeffer B., Berthon P., Popoff M. Y.** 1990
Experimental ovine salmonellosis (*Salmonella abortus ovis*): pathogenesis and vaccination.
Research in Microbiology 141: 945-953.
218. **Parker, H.D., Hawkins Jr, W.W., Brenner, E.** 1966
Epizootiologic studies of ovine virus abortion.
American Journal of Veterinary Research 27 (119): 869-877.
219. **Pelletier, C., Chartier, S., Berthillier, J., Dégletagne, E., Rigaud, C., Berthet, H., Valognes, A., Reynaud, A., Véry, P.** 2006
Validation of an internal method for the diagnosis of infections with *Chlamydophila abortus* and *Coxiella burnetii* by real-time multiplex PCR.
Developments in Biologicals 126: 219–226.
220. **Peter, O., Dupuis, G., Bee, D., Luthy, R., Nicolet, J., Burgdorfer, W.** 1988
Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of chronic Q fever.
Journal of Clinical Microbiology 26:1978-1982.
221. **Peter, O., Dupuis, G., Peacock, M.G., Burgdorfer, W.** 1987
Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of *Coxiella burnetii* antibody.
Journal of Clinical Microbiology 25:1063-1067.
222. **Philips, H.L., Clarkson, M.J.** 2002
Investigation of pre-natal *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci*) exposure of female lambs and the outcome of their first pregnancy.
The Veterinary Journal 163: 329-330.
223. **Pinheiro Junior, J.W., Mota, R.A., Piatti, R.M., Oliveira, A.A., da Silva, A.M., de Oliveira Abreu, S.R., Anderlini, G.A., Valenca, R.M.** 2010
Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila abortus* in Ovine in the State of Alagoas,
Brazilian Journal of Microbiology 41: 358-364.

224. Polkinghorne, A., Borel, N., Becker, A., Lu, Z.H., Zimmermann, D.R., Brugnera, E., Pospischil, A., Vaughan, L. 2009
Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep.
Veterinary Microbiology 135: 142-146.
225. Plommet, M. 1997
Le vaccin Chlamydia ovin: péripéties d'une recherche.
Bulletin de la Société Vétérinaire Pratique de France 81 : 171-178.
226. Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., Zimmermann, D., Gebbers, J.O., 2002.
Abortion in humans caused by *Chlamydia abortus* (Chlamydia psittaci serovar 1). *Schweiz Arch Tierheilkd* 144, 463-466.
227. Pugh, D.G., Baird, A.N. 2012
Sheep and goat medicine. Elsevier Saunders, 621 pages.
228. Radostits, O.M., Blood, D.C., Gay, C.C. 1994
Veterinary medicine. 8^e ed. ELBS Bailliere Tindall. London.
229. Rahal, K., Bennadji, A., Dahmani, A., Dechicha, A., Khaled, H., Merdja, S., Lounes N., Roussete E., Sidi Boumedine K., Thiery R., Laroucau K., Garin-Bastuji B., Bouyoucef, A. 2011
Séroprévalence apparente de la Brucellose, Chlamydie et fièvre Q chez les ovins de la région de Ksar Boukhari.
Recueil Journées Vétérinaires Blida 4: 1-16.
230. Rekiki, A., Sidi Boumedine, K., Souriau, A., Jemli, J., Hammami, S., Rodolakis, A. 2002
Isolation and characterisation of local strains of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) from Tunisia.
Veterinary Research 33:215-222.
231. Rekiki, A., Hammami, S., Rodolakis, A. 2006
Comparative evaluation of a new commercial recombinant ELISA and the complement fixation test for the diagnosis of *Chlamydia abortus* infection in naturally infected flocks in Tunisia.
Small Ruminant Research 66:58-63.
232. Rekiki, A., Thabti, F., Dlissi, I., Russo, P., Sanchis, R., Pepin, M., Rodolakis, A. Hammami, S. 2005
Enquête sérologique sur les principales causes d'avortements infectieux chez les petits ruminants en Tunisie.
Revue de Médecine Vétérinaire 156 (7): 395-401.
233. Rekiki, A. 2004
Chlamydie abortive en Tunisie: Tests de Diagnostic, caractérisation moléculaire, phylogénétique de souches de Chlamydia et Etude de la protection du vaccin vivant IB Thèse de doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé: UFR Sciences et Techniques, Tours: 233 pages.
234. Rhodes, A.J., Van Rooyen, C.E. 1962
Rhodes & van Rooyen: Textbook of virology. 4^e ed: The Williams and Wilkins company, Baltimore, Maryland, USA.
235. Robert, B. Moeller, Jr. 2012
Disorders of sheep and goats. In: Kirkbride's diagnosis of abortion and neonatal loss in animals. Njaa Bradley, L. (Ed). 4^e edition. John Wiley & Sons, Ltd, UK.
236. Roberts, W., Grist, N.R., Giroud, P. 1967
Human abortion associated with infection by ovine abortion agent.
British Medical Journal 4: 37-39.
237. Rocchi, M. S., Wattedegera, S., Meridiani, I., Entrican, G. 2009
Protective adaptive immunity to *Chlamydia abortus* infection and control of ovine enzootic abortion (OEA).
Veterinary Microbiology 135: 112-121.

238. **Rockey, D.D., Matsumoto, A.** 2000
The chlamydial developmental cycle. In: Brun, Y.V., Shimkets, L.J. eds. Prokaryotic Development. Washington D.C. AMS Press: 403-426.
239. **Rodolakis, A., Yousef Mohamad, K.** 2010.
Zoonotic potential of Chlamydia.
Veterinary Microbiology 140: 382-391.
240. **Rodolakis, A.** 2006
Chlamydie et Fièvre Q, similitudes et différences entre ces deux zoonoses.
Rencontres Recherches Ruminants 13.
241. **Rodolakis, A.** 2001
La fièvre Q passe souvent inaperçue.
La semaine vétérinaire, 14 avril, p 40.
242. **Rodolakis, A.** 2000.
Chlamydie abortive: diagnostic et prévention.
Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires 7: 133-137.
243. **Rodolakis, A.** 1998
Diagnostic de la chlamydie et de la fièvre Q.
Association pour l'Etude de la Reproduction Animale 49-54.
244. **Rodolakis, A., Salinas, J., Papp, J.** 1998
Recent advances on ovine chlamydial abortion.
Veterinary Research 29: 275-288.
245. **Rodolakis, A.** 1994
Chlamydie et fièvre Q: agents d'avortements et zoonoses?
Le Point Vétérinaire 26: 845-850.
246. **Rodolakis, A., Bernard, F., Lantier, F.** 1989
Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Research in Veterinary Science* 46 (1): 34-39.
247. **Rodolakis, A., Souriau, A.** 1987
Vaccination against bovine chlamydial abortion with a temperature-sensitive mutant of *Chlamydia psittaci*.
Annales de Recherches Vétérinaires 18: 439-441.
248. **Rodolakis, A., Bernard, F.** 1984
Vaccination with temperature-sensitive mutant of *Chlamydia psittaci* against enzootic abortion of ewes.
Veterinary Record 114: 193-194.
249. **Rodolakis, A., Souriau, A.** 1983
Response of Ewes to Temperature-sensitive Mutants of *Chlamydia psittaci* (var ovis) obtained by NTG Mutagenesis.
Annales de Recherches Vétérinaires 14: 155-161.
250. **Rodolakis, A., Souriau, A.** 1980
Clinical evaluation of immunity following experimental or natural infection of ewes with *Chlamydia psittaci* (var. ovis)
Annales de Recherches Vétérinaires 11: 215-223.
251. **Rodolakis, A., SOURIAU, A.** 1979
Clinical Evaluation of Commercial Vaccine against Chlamydia Abortif of Ewes.
Annales de Recherches Vétérinaires 10: 41-48.

252. **Rodolakis, A., Bernard, K.** 1977
Isolement de *Chlamydophila* des organes génitaux de béliers atteints d'épididymite.
Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 50 : 65-70.
253. **Rodolakis, A., Chancerelle, L.** 1977
Dénombrement direct à l'isolement de *Chlamydia psittaci* au moyen de la technique des plages de lyse.
Annales de Microbiologie (Institut Pasteur) 128 B : 81-85.
254. **Rousset, E., Russo, P., Pepin, M., Raoult, D.** 2000
La fièvre Q, une zoonose encore mystérieuse.
Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires 7: 138-143.
255. **Salih Alj Debbarh, H., Hasnaoui, H., Souriau, A., Belhouari, A., Saile, R., Rodolakis, A.** 2001
Chlamydiose abortive des petits ruminants au Maroc : valeur épidémiologique d'un kit Elisar de *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* sérotype 1).
Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux 54 : 201-205.
256. **Salti-Montesanto, V., Tsoli, E., Papavassiliou, P., Psarrou, E., Markey, B.K., Jones, G.E., Vretou, E.** 1997
Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1.
American Journal of Veterinary Research 58: 228-235.
257. **Samkange, A., Katsande, T.C., Tjipura-Zaire, G., Crafford, J.E.** 2010
Seroprevalence survey of *Chlamydophila abortus* infection in breeding goats on commercial farms in the Otavi Veterinary District, northern Namibia.
The Onderstepoort journal of veterinary research 77: E1-5.
258. **Sammin, D.J., Markey, B.K., Bassett, B.K., Buxton, D.** 2008
The ovine placenta and placentitis: a review.
Veterinary Microbiology: 135, 90-97
259. **Sammin, D.J., Markey, B.K., Quinn, P.J., McElroy, M.C., Bassett, H.F.** 2006
Comparaison of fetal and maternal inflammatory responses in the ovine placenta after experimental infection with *Chlamydophila abortus*.
Journal of Comparative Pathology 135: 83-92.
260. **Sammin, D.J., Markey, B.K., Bassett, H.F., MC Elroy, M.C.** 2005
Rechallenge of previously-infected pregnant ewes with *Chlamydophila abortus*.
Veterinary Research Communications 29: 81-98.
261. **Sanchis, R., Polveroni, G., Pardon, P.** 1985
Sérodiagnostic de la salmonellose abortive des brebis à *Salmonella abortus ovis*.
Bulletin Laboratoire Vétérinaire 19/20: 45-51.
262. **Santos, C.S.A.B., Piatti, R.M., Azevedo, S.S., Alves, C.J., Higino, S.S.S., Silva, L.C.R.M., Brasil, A.W.A., Gennari, S.M.** 2012
Seroprevalence and risk factors associated with *Chlamydophila abortus* infection in dairy goats in the Northeast of Brazil.
Pesquisa Veterinária Brasileira 32 (11): 1082-1086.
263. **Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., Meyer, K.F.** 1975
Serotyping of *Chlamydia*: isolates of bovine origin.
Infection and Immunity 11: 904-907.
264. **Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J., Meyer, K.F.** 1974
Serotyping of *Chlamydia*. I. Isolates of ovine origin.
Infection and Immunity 9: 92-94.

265. **Sebbag, H.** 2011
Les Chlamydiales. Cours U.V.63 : Microbiologie générale et médicale. Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique. Département de Biologie, Pathologie et Sciences de l'aliment.
266. **Serbezov, V.S, Kazár, J., Novkirishki, V., Gatcheva, N., Kováčová, E., Voynova, V.** 1999
Q fever in Bulgaria and Slovakia.
Emerging Infectious Diseases 5: 388-394.
267. **Shafer, M.A.B., Tebb, K.P., Pantell, R.H., Wibbelsman, C.J., Neuhaus, J.M., Tipton, A.C., Brown Kunin, S., Ko, T.H., Schweppe, D.M., Bergman, D.A.** 2003
A clinical practice improvement intervention increased chlamydial screening rates in sexually active adolescent girls.
Evidence-Based Obstetrics & Gynecology 5:122-123.
268. **Shareef, J.M.** 2006
A review of serological investigations of brucellosis among farm animals and humans in northern provinces of Iraq (1974–2004).
Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health 53: 38-40.
269. **Sheehy, N., Markey, B., Gleeson, M., Quinn, P.J.** 1996
Differentiation of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* strains by species-specific PCR.
Journal of Clinical Microbiology 34: 3175-3179.
270. **Shewen, P.E.** 1980
Chlamydial infection in animals: a review.
Canadian Veterinary Journal 21: 2-11.
271. **Smith, M.C., Sherman, D.M.** 2009
Goat medicine. 2^e edition. Ames, IA: Wiley-Blackwell, page 871.
272. **Smith, M.C., Sherman DM.** 1994
Goat medicine. 1^{ère} ed. Lea & Febiger, 620 pages.
273. **Souriau, A., De Sa, C., Rodolakis, A.** 1996
Chlamydia abortive et vaccination. Présenté à 3. Rencontres, Recherches, Ruminants, Institut de l'Elevage, Paris (FRA), 1996/12/04-05, 153-156.
274. **Souriau, A., Salinas, J., De Sa, C., Layachi, K., Rodolakis, A.** 1994
Identification of subspecies- and serotype 1-specific epitopes on the 80-90 kDa protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion.
American Journal of Veterinary Research 55:510-514.
275. **Souriau, A., Le Rouzic, E., Bernard, F., Rodolakis, A.** 1993.
Differentiation of abortion-inducing and intestinal strains of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants by the microimmunofluorescence test.
Veterinary Record 132: 217-219.
276. **Souriau, A., Rodolakis, A.** 1986
Rapid detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal swabs of aborted ewes and goats by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).
Veterinary Microbiology 11: 251-259.
277. **SPSS 20.0**, 2011.
SPSS software for windows evaluation version. SPSS Inc., Chicago, IL, USA.
278. **Stamp, J.T., McEwen, A. D., Watt, J. A. A. and Nisbet, D. I.** (1950).
Enzootic abortion in ewes: I. Transmission of the disease. *Veterinary Record*, 62, 251-254.

279. **Stephens, R.S., Myers, G., Eppinger, M., Bavoil, P.M.** 2009
Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved.
FEMS Immunology and Medical Microbiology 55: 115-119.
280. **Stephens, R.S.** 2003
The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis.
Trends in Microbiology 11: 44-51.
281. **Storz, J.** 1971
Chlamydomphila and *Chlamydomphila*-Induced Diseases. 1^{ère} Ed. Springfield: Charles C
Thomas-Publisher, 358 pages.
282. **Storz, J., Page, L.A.** 1971
Taxonomy of the chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus Chlamydia, family Chlamydiaceae, in
a separate order, Chlamydiales ord. nov.
International Journal of Systematic Bacteriology 21: 332-334.
283. **Stuen, S., Longbottom, D.** 2011
Treatment and control of chlamydial and rickettsial infections in sheep and goats.
The Veterinary clinics of North America. Food animal practice 27: 213-233.
284. **Szeredi, L., Bacsadi, A.** 2002.
Detection of *Chlamydomphila* (*Chlamydia*) *abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine
abortion by the streptavidin-biotin method.
Journal of Comparative Pathology 127: 257-263.
285. **Tadjebakhe, H., Desliens, M., Hedjazi, M.** 1971
Etude bactériologique d'enzooties d'avortements causés par *Salmonella Abortus ovis* en Iran.
Revue de Médecine Vétérinaire 122: 621-628.
286. **Talafha, A.Q., Ababneh, M.M., Ababneh, M.M., Al-Majali, A.M.** 2012
Prevalence and risk factors associated with *Chlamydomphila abortus* infection in dairy herds in Jordan.
Tropical Animal Health and Production 44: 1841-1846.
287. **Tam, M.R., Stamm, W.E., Handsfield, H.M., Stephens, R., Kuo, C.C., Holmes, K.K., Ditzenberger, K.,
Krieger, M., Nowinski, R.C.** 1984
Culture independent diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using monoclonal antibodies. *The New England Journal of
Medicine* 310:1146-1150.
288. **Tang, F.F., Chang, H.L., Huang, Y.T., Wang, K.C.** 1957
Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo.
Chinese Medical Journal 75: 429-447.
289. **Teankum, K., Pospischil, A., Janett, F., Brugnera, E., Hoelzle, L.E., Hoelzle, K.,
Weilenmann, R., Zimmermann, D.R., Gerber, A., Polkinghorne, A., Borel, N.** 2007 Prevalence of chlamydiae
in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks.
Theriogenology 67 : 303-310.
290. **Teare, E.L., Sexton, C., Lim, F., McManus, T., Uttley, A.H.C., Hodgson, J.** 1985
Conventional tissue-culture compared with rapid immunofluorescence for identifying *C. trachomatis* in specimens
from patients attending a genitourinary clinic.
Genitourinary Medicine 61:379-382.
291. **Terskikh, I.I., Dzhavad-Zade, M.D., Kakhramanov, T.B., Popova, O.M., Mailova-
Kasumova, A.D.** 1977
Role of Chlamydia in the pathology of pregnancy and chronic gynecological diseases.
Voprosy Virusologii 484-488.

292. **Teshale, S., Dumetre, A., Darde, M.L., Merga, B., Dorchies, P.** 2007
Serological survey of caprine toxoplasmosis in Ethiopia: prevalence and risk factors.
Parasite 14: 155-159.
293. **Thomas, R., Davidson, H.C., Wilsmore, A.J.** 1990
Use of IDEIA™ ELISA to detect *C. psittaci* (ovis) in material from aborted foetal membranes and milk from ewes affected by ovine enzootic abortion.
British Veterinary Journal 146, 364-367.
294. **Thomson, N.R., Yeast, C., Bell, K., Holden, M.T.G., Bentley, S.D., Livingstone, M., Cerdeno-Tarraga, A.M., Harris, B., Doggett, J., Ormond, D., Mungall, K., Clarke, K., Feltwell, T., Hance, Z., Sanders, M., Quail, M.A., Price, C., Bareel, B.G., Parkhill, J., Longbottom, D.** 2005
The *Chlamydomphila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation.
Genome Research 15: 629-640.
295. **Thrusfield, M.** 2007
Veterinary Epidemiology. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
296. **Thygeson, P.** 1962
Trachoma virus: historical background and review of isolates.
Annals of the New York Academy of Sciences 98, 6-13.
297. **Thygeson, P.** 1934
The etiology of inclusion blenorrhea.
American Journal of Ophthalmology 17: 1019-1026.
298. **Tijam, K.H., Vaneijk, R.V.W., Vanheijst, B.Y.M., Tideman, G.J., Vanjoost, T., Stolz, E., Michel, M.F.** 1985
Evaluation of the direct fluorescent-antibody test for diagnosis of chlamydial infection. *European Journal of Clinical Microbiology* 4:548-555.
299. **Uyeda, C.T., Welborn, P., Ellison-Birang, N., Shunk, K., Tsaouse, P.** 1984
Rapid diagnosis of chlamydial infections with microtract direct test.
Journal of Clinical Microbiology 20:948-950
300. **Venables, C., Dawson, M., Baskerville, M.** 1989
Chlamydia in ovine milk.
Veterinary Record 125: 137.
301. **Vretou, E., Radouani, F., Psarrou, E., Kritikos, I., Xylouri, E., Mangana, O.** 2007
Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydomphila abortus* antibodies.
Veterinary Microbiology 123 (1-3): 153-161.
302. **Waag, D., Chulay, J., Marrie, T., England, M., Williams, J.** 1995
Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 14 (5): 421-427.
303. **Walder, G., Hotzel, H., Brezinka, C., Gritsch, W., Tauber, R., Wurzner, R., Ploner, F.** 2005
An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydomphila abortus*.
Obstetrics and Gynecology 106: 1215-1217.
304. **Ward, M.E.** 1988
The chlamydial developmental cycle. In: Microbiology of Chlamydia, A.L. Barron, (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida: 71-95.
305. **Watson, M.W., Lambden, P.R., Clarke, I.N.** 1991
Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene.
Journal of Clinical Microbiology 29: 1188-1193.

306. **Wheelhouse, N., Longbottom, D.** 2012
Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. *Transboundary and Emerging Diseases* 59: 283-291.
307. **Williams E., O'Donovan J., Marques P., Sammin D., Brady C., Worrall S., Nally J., Bassett H., Sachse K., Markey B.** 2008
Quantification of *Chlamydia abortus* in ovine maternal and foetal tissues using real-time PCR. Proceedings of the Sixth Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Aarhus, Denmark. p. 316.
308. **Williams, J.C, Thomas, L.A., Peacock, M.G.** 1986
Humoral immune response to Q fever: Enzyme-linked immunosorbent assay antibody response to *Coxiella burnetii* in experimentally infected guinea pigs.
Journal of Clinical Microbiology 24 (6): 935-939.
309. **Wilsmore A. J., Izzard K. A., Wilsmore B.C., Dagnall, G.J.** 1990
Breeding performance of sheep infected with *Chlamydia psittaci* (ovis) during their preceding pregnancy.
Veterinary Record 126: 40-41.
310. **Wilsmore, A.J.** 1989
Chlamydia in ovine milk.
Veterinary Record 124: 618-619.
311. **Wilsmore, A.J., Parsons, V., Dawson, M.** 1984
Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion.
British Veterinary Journal 140: 380-391.
312. **Wilson, K., Livingstone, M., Longbottom, D.** 2009
Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydia abortus* infection in sheep.
Veterinary Microbiology 135: 38-45.
313. **Wirz-Dittus, S., Belloy, L., Hussy, D., Waldvogel, A.S., Doherr, M.G.** 2010
Seroprevalence survey for *Salmonella abortus ovis* infection in Swiss sheep flocks.
Preventive Veterinary Medicine 97: 126-130.
314. **Wong, S.Y., Gray, E.S., Buxton, D., Finlayson, J., Johnson, F.W.** 1985
Acute placentitis and spontaneous abortion caused by *Chlamydia psittaci* of sheep origin: a histological and ultrastructural study.
Journal of Clinical Pathology 38: 707-711.
315. **World Organization for Animal Health (OIE).** 2000
Q fever. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4th edition, Chapter X. 10. OIE, Paris. pages 822-831.
316. **World Organization for Animal Health (OIE).** 2008
Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Enzootic abortion of ewes.
317. **World Organization for Animal Health (OIE).** 2013
Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Enzootic abortion of ewes.
Site disponible sur : http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.
Page consultée le 28 décembre 2013.
318. **Wyllie, S., Ashley, R.H., Longbottom, D., Herring, A.J.** 1998
The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel.
Infection and Immunity 66: 5202-5207.
319. **Wyrick, P.B.** 2000
Intracellular survival by *Chlamydia*.
Cellular Microbiology 2: 275-282.

320. **Yahiaoui, W.I., Afri-Bouzebda, F., Bouzebda, Z., Dahmani, A.** 2013

Sondage sérologique de la fièvre Q chez les ovins par la méthode ELISA et prévalence des avortements dans la région de Ksar El Boukhari (Algérie).

Tropicultura 32 (1) : 22-27.

321. **Yousef Mohamad, K.** 2009

Diversité génétique des souches de Chlamydophila pecorum : Recherche et identification des marqueurs épidémiologiques. Thèse de doctorat : Ecole doctorale Santé, Sciences, Technologies. Université François-Rabelais de Tours. Sciences de la Nature et de la vie et de la santé. 209 pages.

322. **Zaibet, L., Hammami, S., Jabbar, M.** 2009

Durabilité des systèmes d'élevage des petits ruminants en Tunisie: Une approche de santé animale et marketing. In: Institute, I.L.R. (Ed.), Discussion paper N°17, City, p. 138.

323. **Zhao, Q., Schachter, J., Stephens, R. S.** 1993

Lack of allelic polymorphism for the major outer membrane protein gene of the agent of guinea pig inclusion conjunctivitis (*Chlamydia psittaci*).

Infection and Immunity 61: 3078-3080.

324. **Zundel, E., Verger, J.M, Grayon, M., Michel, R.** 1992

Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses.

Annals of Veterinary Research 23 (2): 177-188.

Annexes

ANNEXE 1

MATERIEL UTILISE DANS LES TECHNIQUES SEROLOGIQUES

1. Matériel pour prélèvement de sang et recueil de sérums

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

2. Matériel pour les tests de type ELISA

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

- Lecteur ELISA pour microplaques à 96 puits équipé d'un filtre à 450 nm (ELx800™, Biotek®).

3. Matériel pour le test de séroagglutination rapide sur lame

- Pipette automatique à embouts plastiques interchangeables délivrant 25 à 30 µl.
- Antigène tamponné acide, coloré par le Rose Bengale (BENGATEST, SYNBIOTICS CORPORATION®).
- Compte-gouttes calibrés à 30 µl pour la distribution de l'antigène (fourni dans la boîte de BENGATEST).

4. Matériel pour le test classique de séroagglutination lente

- Antigène : Suspension colorée d'antigène H de *Salmonella abortus ovis* (Fabrication locale, étalonnée sur celle de l'AFSSA de Sophia Antipolis).
- Phosphate Buffered Saline (PBS).
- Microplaques.
- Pipette automatique à embouts plastiques interchangeables délivrant 25 µl.
- Incubateur de microplaques (37°C).

ANNEXE 2

LSIVET RUMINANT SERUM CHLAMYDIOSIS ELISA KIT

Kit de 2 plaques sécables (192 tests) utilisable sur sérums individuels (ou plasmas) de ruminants (bovins, ovins et caprins).

1. Principe du test

Le principe du test est une technique immuno-enzymatique indirecte. Les échantillons et les contrôles sont déposés dans la plaque sensibilisée avec de l'antigène *Chlamydia*. Les anticorps spécifiques éventuellement présents se lient à l'Ag.

2. Composants du kit

Réactifs	Description
Réactif 1	Microplaque sensibilisée avec de l'antigène de <i>Chlamydia</i> . Sécable : 12 X 8
Réactif 2	Contrôle négatif <i>Chlamydia</i>
Réactif 3	Contrôle positif <i>Chlamydia</i>
Réactif 4	Conjugué anti-ruminant HRP 100 fois concentré (rose)
Réactif A	Solution de lavage 10 fois
Réactif B1	Tampon de dilution des échantillons (vert). Prêt à l'emploi
Réactif B2	Tampon de dilution du Conjugué. Prêt à l'emploi
Réactif C	Solution substrat. Prêt à l'emploi
Réactif D	Solution d'arrêt. Prêt à l'emploi

3. Matériel nécessaire mais non fourni avec le kit

1. Centrifugeuse (2000 x g).
2. Tubes à centrifuger et microtubes.
3. Micro pipette de précision et multicanaux.
4. Embouts de pipettes à usage unique.
5. Plaque de prédilution.
6. Vortex ou équivalent.
7. Eau distillée (ou qualité supérieure).
8. Laveur de microplaques manuel, semi-automatique ou automatique.
9. Incubateur de microplaques ($37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).
10. Lecteur ELISA équipé d'un filtre à 450 nm ou de filtres à 450 et 620 nm.

4. Préparation des échantillons

Les échantillons et les contrôles sont testés dilués au 1/400 en **Sample Dilution Buffer (Réactif B1)**. Pour cela effectuer 2 dilutions successives :

A- Dans une plaque de prédilution diluer au 1/20 les échantillons et les contrôles en **Sample Dilution Buffer**. Par exemple :

1. Déposer **5 µl** de chaque sérum et contrôle sur la plaque de prédilution. Conserver le même ordre que celui qui sera utilisé sur la plaque sensibilisée.
2. Ajouter ensuite **95 µl** de **Sample Dilution Buffer** dans chaque cupule occupée par les contrôles et les échantillons. Agiter doucement la plaque.
3. Laisser les sérums dilués s'équilibrer dans le Sample Dilution Buffer à température ambiante pendant 5 minutes avant le transfert dans la plaque sensibilisée.
4. Les sérums dilués doivent être testés dans les 24 heures et peuvent être conservés à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

B- Diluer les échantillons et les contrôles pré-dilués au 1/20 en Sample Dilution Buffer dans la plaque sensibilisée avec l'antigène *Chlamydomphila* :

1. Déposer **5 µl de sérum et contrôle pré-dilués 1/20** dans les puits de la plaque sensibilisée.
2. Ajouter **95 µl de Sample Dilution Buffer** dans chaque cupule occupée par les contrôles et les échantillons. Agiter doucement la plaque.

5. Préparation des réactifs

- Réactif A : **Solution de Lavage 10 fois concentrée.**

Solution à diluer au **1/10 dans de l'eau distillée.**

Exemple :

Pour une barrette : 2 ml de Wash Solution Concentrée (10x) dans 18 ml d'eau distillée.

Pour une plaque : 25 ml de Wash Solution Concentrée (10x) dans 225 ml d'eau distillée.

Mélanger après dilution. La Wash Solution diluée peut être conservée 1 mois à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

- Réactif 4 : **Conjugué anti-ruminant HRP 100 fois concentré.**

Solution à diluer au 1/100 dans le **Conjugate Dilution Buffer** (Réactif B2). Mélanger après dilution. La solution de conjugué est à utiliser **immédiatement** après préparation.

6. Mode opératoire

Porter les réactifs à température ambiante ($21 \pm 4^\circ\text{C}$) avant la réalisation du test.

Distribution des contrôles et des échantillons

Contrôles et échantillons à analyser au 1/400 en Sample Dilution Buffer :

- Déposer **5 μl** de **Positive Control *Chlamydomphila* pré-dilué au 1/20** dans les cupules A1 et B1 (par exemple).
- Déposer **5 μl** de **Negative Control *Chlamydomphila* pré-dilué au 1/20** dans les cupules C1 et D1 (par exemple).
- Déposer **5 μl** d'**Echantillon pré-dilué 1/20** dans les cupules suivantes.
- Distribuer **95 μl** de **Sample Dilution Buffer** dans toutes les cupules utilisées pour les échantillons et les contrôles.

Agiter doucement la plaque puis la couvrir à l'aide d'un adhésif de plaque. **Incuber la plaque 1 heure à $37 \pm 2^\circ\text{C}$.**

Lavages

Vider la plaque et réaliser **4 lavages** avec la Wash Solution Diluée. Les lavages seront réalisés sous un volume de **300 μl** par cupule. Vider et taper la plaque sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de liquide. Alternativement, laver la plaque avec un **laveur automatique**.

Dépôt du conjugué

Distribuer dans chaque cupule 100 μl d'HRP Conjugate *Chlamydomphila* dilué au 1/100 en Conjugate Dilution Buffer.

Agiter doucement la plaque puis la couvrir à l'aide d'un nouvel adhésif de plaque.

Incuber la plaque 1 heure à $37^\circ \pm 2^\circ\text{C}$.

Lavages

Vider la plaque et **réaliser 4 lavages** avec la Wash Solution diluée.

Les lavages seront réalisés sous un volume de **300 μl** par cupule. Vider et taper la plaque sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de liquide. Alternativement, laver la plaque avec un **laveur automatique**.

Révélation

Distribuer dans chaque cupule 100 µl de Substrate Solution (Réactif C). Agiter doucement la plaque (2 secondes). **Incuber 10 minutes à température ambiante ($21 \pm 4^\circ\text{C}$) et à l'obscurité.** Ne pas couvrir la plaque.

Distribuer dans chaque cupule 100 µl de **Stop Solution** (Réactif D).

Distribuer la Stop Solution dans le même ordre que celui de la Substrate Solution. Agiter doucement la plaque (2 secondes).

Lecture

Essuyer avec un chiffon doux le dessous des plaques, pour éliminer d'éventuelles poussières. Lire la plaque au maximum 30 minutes après l'arrêt de la réaction, à 450 nm en monochromatisme ou à 450-620 nm en bichromatisme.

7. Validation du test

Le test est validé si :

$$\begin{aligned} \mathbf{Do_m CP} &> \mathbf{0.400} \\ \mathbf{Do_m CP} &> \mathbf{2 \times Do_m CN} \end{aligned}$$

8. Calcul et interprétation des résultats

Calculer la Densité Optique moyenne du Negative Control : $Do_m \text{ CN}$

Calculer la Densité Optique moyenne du Positive Control : $Do_m \text{ CP}$

Calculer la DO corrigée (DO_c) de chaque échantillon : $DO_c = DO_{\text{Ech}} - DO_m \text{ CN}$

Calculer le ratio S/P de l'échantillon :

$$\mathbf{S/P = DO_{\text{Ech}} / (Do_m \text{ CP} - Do_m \text{ CN})}$$

Les résultats peuvent également être rendus sous forme de titres:

$$\mathbf{Titre = S/P \times 100}$$

RESULTAT	INTERPRETATION
Titre \leq 25	NEGATIF
25 < Titre \leq 35	POSITIF +
35 < Titre \leq 60	POSITIF ++
60 < Titre \leq 100	POSITIF +++
Titre > 100	POSITIF ++++

ANNEXE 3

LSIVET RUMINANT MILK/SERUM Q FEVER KIT

Kit de 2 ou 5 plaques sécables (192 ou 480 tests) utilisable sur sérums individuels (ou plasma), lait individuels et mélanges de ruminants (bovins, ovins et caprins).

1. PRINCIPE DU TEST

Le principe du test est une technique immunoenzymatique indirecte.

- Les échantillons et les contrôles sont déposés dans la plaque sensibilisée avec de l'antigène Fièvre Q. Les anticorps spécifiques anti-Fièvre Q éventuellement présents se lient à l'Ag.
- Après lavage, un conjugué protéine G marqué à la peroxydase est ajouté et se fixe sur les anticorps préalablement fixés sur les microcupules.
- Le conjugué non fixé est éliminé par lavage avant addition d'un substrat chromogène. L'apparition d'une coloration bleue est la conséquence de l'oxydation du substrat par la peroxydase du conjugué.
- Après arrêt de la réaction, la coloration devient jaune. La lecture des résultats est réalisée par un lecteur de plaques ELISA.

L'apparition d'une coloration jaune indique un échantillon positif. La coloration de chaque puits est proportionnelle aux taux d'anticorps spécifiques Fièvre Q présents dans l'échantillon dilué.

2. COMPOSITION DU KIT

- **Réactif 1** : Coated microtiter plate for Q Fever Ab detection : microplaque ELISA en 12 barrettes de 8 cupules.
- **Réactif 2a** : Serum Negative Control Q Fever : Contrôle Négatif *Coxiella burnetii* sérum.
- **Réactif 2b** : Milk Negative Control Q Fever : Contrôle Négatif *Coxiella burnetii* lait.
- **Réactif 3** : Serum Positive Control Q Fever : Contrôle positif *Coxiella burnetii* sérum.
- **Réactif 4** : HRP Conjugate Q fever (100x) : Conjugué HRP protéine G 100 fois concentré (violet).
- **Réactif A** : Wash Solution (10x) : Solution de lavage 10 fois concentrée.
- **Réactif B1** : Sample Dilution Buffer : Tampon de dilution des échantillons. Prêt à l'emploi (vert).
- **Réactif B2** : Conjugate Dilution Buffer : Tampon de dilution du Conjugué. Prêt à l'emploi.
- **Réactif C** : Substrate Solution : Solution Substrat. Prêt à l'emploi.

- **Réactif D** : Stop Solution : Solution d'Arrêt. Prêt à l'emploi.
- Adhésifs de plaques : 4 (pour kit 2 plaques) ou 10 (pour kit 5 plaques).
- Notice du kit.
- Certificat d'analyse.

3. ECHANTILLONS

Les sérums individuels et contrôles serum sont testés dilués au 1/400 en Sample Dilution Buffer. Des sérums ou plasma frais, réfrigérés (8 jours à $5 \pm 3^\circ\text{C}$) ou congelés (1 an à -20°C) sont utilisables.

A. Dans une plaque de prédilution diluer au 1/20 les échantillons et les contrôles en Sample Dilution Buffer. Par exemple :

1. Déposer 5 μl de chaque sérum et contrôle sur la plaque de prédilution. Conserver le même ordre que celui qui sera utilisé sur la plaque sensibilisée.
2. Ajouter ensuite 95 μl de Sample Dilution Buffer (Réactif B1) dans chaque cupule occupée par les contrôles et les échantillons. Agiter doucement la plaque.
3. Laisser les sérums dilués s'équilibrer dans le Sample Dilution Buffer à température ambiante pendant 5 minutes avant le transfert dans la plaque sensibilisée.
4. Les sérums dilués doivent être testés dans les 24 heures et peuvent être conservés à $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

B. Diluer les échantillons et les contrôles pré-dilués au 1/20 en Sample Dilution Buffer dans la plaque sensibilisée avec l'antigène Fièvre Q :

1. Déposer 5 μl de sérum et contrôle pré-dilués 1/20 dans les puits de la plaque sensibilisée.
2. Ajouter 95 μl de Sample Dilution Buffer (Réactif B1) dans chaque cupule occupée par les contrôles et les échantillons. Agiter doucement la plaque.

4. PREPARATION DES REACTIFS

- Sample Dilution Buffer, Conjugate Dilution Buffer, Substrate Solution, Stop Solution : prêt à l'emploi.
- Wash Solution (10x) (Réactif A) : Solution de lavage 10 fois concentrée. Solution à diluer au 1/10 dans de l'eau distillée.

Exemple :

Pour une barrette : 2 ml de Wash Solution concentrée (10x) dans 18 ml d'eau distillée.

Pour une plaque : 25 ml de Wash Solution concentrée (10x) dans 225 ml d'eau distillée.

Mélanger après dilution. La Wash Solution diluée peut être conservée 1 mois à $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

- HRP Conjugate Q Fever (100x) (Réactif 4) : Conjugué protéique G HRP 100 fois concentré. Solution à diluer au 1/100 dans le Conjugate Dilution Buffer (Réactif B2). Mélanger après dilution. La solution de conjugué diluée est à utiliser immédiatement après préparation.

5. MODE OPERATOIRE

Porter les réactifs à température ambiante ($21 \pm 4^\circ\text{C}$) avant la réalisation du test.

La zone de tolérance des temps d'incubation est de $\pm 10\%$.

Il est recommandé d'utiliser des racks à usage unique pour la distribution des composants (Sample Dilution Buffer, HRP Conjugate Q fever dilué, Substrate Solution, Stop Solution).

Distribution des contrôles et des échantillons :

Contrôles et échantillons à analyser au 1/400 en Sample Dilution Buffer :

- Déposer 5 μl de Serum Positive Control Q Fever pré-dilué 1/20 dans les cupules A1 et B1.
- Déposer 5 μl de Serum Negative Control Q Fever pré-dilué 1/20 dans les cupules C1 et D1.
- Déposer 5 μl d'échantillon pré-dilué 1/20 dans les cupules suivantes.
- Distribuer 95 μl de Sample Dilution Buffer (Réactif B1) dans toutes les cupules utilisées pour les échantillons et les contrôles.
- Agiter doucement la plaque puis la couvrir à l'aide d'un adhésif de plaque. **Incuber la plaque 1 heure à $37 \pm 2^\circ\text{C}$.**

Lavages :

Vider la plaque et réaliser 3 lavages avec la Wash Solution diluée.

Les lavages sont réalisés sous un volume de 300 μl par cupule. Vider et taper la plaque sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de liquide. Alternativement, laver la plaque avec un laveur automatique.

Dépôt du conjugué

Distribuer dans chaque cupule 100 μl d'HRP Conjugate Q Fever dilué au 1/100 en Conjugate Dilution Buffer. Agiter doucement la plaque puis la couvrir à l'aide d'un nouvel adhésif de plaque. Incuber la plaque 1 heure à $37^\circ \pm 2^\circ\text{C}$.

Lavages

Vider la plaque et réaliser 3 lavages avec la Wash Solution diluée.

Les lavages sont réalisés sous un volume de 300 µl par cupule. Vider et taper la plaque sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de liquide. Alternativement, laver la plaque avec un laveur automatique.

Révélation

Distribuer dans chaque cupule 100 µl de Substrate Solution (Réactif C). Agiter doucement la plaque (2 secondes). **Incuber 10 minutes à température ambiante (21± 4°C) et à l'obscurité.** Ne pas couvrir la plaque.

Distribuer dans chaque cupule 100 µl de Stop Solution (Réactif D).

Distribuer la Stop Solution dans le même ordre que celui de la Substrate Solution. Agiter doucement la plaque (2 secondes).

Lecture

Essuyer avec un chiffon doux le dessous des plaques, pour éliminer d'éventuelles poussières. Lire la plaque **au maximum 30 minutes après l'arrêt de la réaction à 450 nm** en monochromatisme ou à 450-620 nm en bichromatisme.

6. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la Densité Optique moyenne du Serum Negative Control : $DO_m\text{ CN}$

Calculer la Densité Optique moyenne du Serum Positive Control : $DO_m\text{ CP}$

Pour chaque échantillon, calculer le ratio S/P (Sample/Positive)

$$S/P = DO_{\text{Ech}} - DO_m\text{ CN} / (DO_m\text{ CP} - DO_m\text{ CN})$$

Les résultats sont rendus sous forme de titre:

$$S/P \times 100$$

7. VALIDATION Le test est valide si : $DO_m\text{ CP} > 0,400$ et $DO_m\text{ CP} > 2 \times DO_m\text{ CN}$

8. INTERPRETATION DES RÉSULTATS

RESULTAT	INTERPRETATION
Titre ≤ 40	NEGATIF
40 < Titre ≤ 100	POSITIF +
100 < Titre ≤ 200	POSITIF ++
200 < Titre ≤ 300	POSITIF +++
Titre > 300	POSITIF ++++

ANNEXE 4

Trousse ELISA sérologique *Neospora caninum* : Trousse pour le diagnostic sérologique de *Neospora caninum* par la méthode ELISA. Test de blocage pour sérums sanguins

1. Composition de la trousse

- **Microplaques** : microplaques de 96 puits (12 x 8). L'entièreté des microplaques est sensibilisée avec la protéine SRS2.
- **Solution de lavage** : 1 flacon de solution de lavage concentrée 20 fois. La solution cristallise spontanément à froid. En cas d'utilisation partielle de la solution, amener le flacon à 21°C +/- 3°C de façon à ce que tous les cristaux disparaissent; bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire. Diluer 20 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
- **Tampon de dilution**: 1 flacon de tampon de dilution concentré 5x. Cette solution est utilisée pour la dilution des sérums sanguins et du conjugué. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.
- **Conjugué** : 1 flacon de conjugué anti-SRS2: (anticorps monoclonal anti-protéine SRS2 de *Neospora caninum* couplé à la peroxydase de raifort).
- **Sérum positif** : flacon contenant le sérum positif. Reconstituer ce sérum avec 0,5 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Après reconstitution, le sérum se conserve à -20°C.
- **Sérum négatif** : flacon contenant le sérum négatif. Reconstituer ce sérum avec 0,5 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Après reconstitution, le sérum se conserve à -20°C.
- **Solution de TMB monocomposant** : 1 flacon de chromogène TMB (tétraméthylbenzidine). Ce réactif se conserve entre +2°C et +8°C à l'abri de la lumière. Il est prêt à l'emploi.
- **Solution d'arrêt** : 1 flacon de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

Composition du kit Bio-X Diagnostics (BIO K 218) pour la recherche des anticorps anti-*Neospora caninum*.

Réactifs	Quantité
1. Microplaques	2
2. Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
3. Tampon de dilution	1 X 60 ml (1 X)
4. Conjugué	1 X 25 ml (1 X)
5. Sérum positif	1 X 0,5 ml (1 X) lyophilisé
6. Sérum négatif	1 X 0,5 ml (1 X) lyophilisé
7. Solution TMB mono-composant	1 X 25 ml (1 X)
8. Solution d'arrêt	1 X 15 ml (1 X)

2. Matériel supplémentaire et équipements requis

Eau distillée, cylindres gradués, Berlins, tubes en plastic, portoir pour tubes, pointes, réservoir à réactifs pour pipettes multicanaux, couvercle, adhésif pour microplaques, pipettes automatiques graduées (mono et multicanaux), lecteur de microplaque, laveur et agitateur de microplaques (optionnel).

3. Mode opératoire

- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation.
- Diluer la solution de lavage concentrée 20 X dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
- Contrôler que tous les cristaux ont disparu avant de diluer la solution. Diluer la solution de dilution concentrée 5 X dans de l'eau distillée ou déminéralisée. Conserver les solutions diluées entre +2°C et +8°C.
- Diluer au 1/2 les sérums sanguins dans le tampon de dilution. Procéder de la même manière pour les sérums de référence (sérums positif et négatif).
- Retirer la microplaque de son emballage.
- Distribuer les échantillons dilués à raison de 100 µl par puits. Procéder de la même manière pour les sérums de référence (sérums positif et négatif).
- Incuber 2 heures à 37°C avec couvercle.
- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée selon les modalités définies au chapitre "composition de la trousse". Pour ce faire, éliminer le contenu de la microplaque en la retournant brutalement au-dessus d'un évier. Tapoter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. A l'aide d'une pissette ou par immersion dans un récipient de dimension adéquate, remplir les cupules utilisées avec la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus d'un évier. Répéter deux fois toute l'opération en évitant tout particulièrement la formation de bulles dans les cupules.
- Diluer au 1/50 le conjugué dans le tampon de dilution (par exemple pour une plaque, diluer 250 µl de la solution mère de conjugué dans 12,250 ml de solution de dilution.).
- Ajouter dans chaque puits utilisé, 100 µl du conjugué. Incuber la plaque à 37°C durant ½ heure avec couvercle.
- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage.
- Distribuer le TMB sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution doit être parfaitement incolore. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une

contamination de la solution par de la peroxydase. Si cette éventualité se présente, la solution doit être éliminée et du nouveau TMB doit être prélevé avec du matériel parfaitement propre.

- Incuber 30 minutes à 21°C +/- 3°C et à l'abri de la lumière, sans couvrir. Ce temps n'est donné qu'à titre indicatif car dans certaines circonstances, il pourra être utile de l'allonger ou de le raccourcir.
- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits.
- Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm.
- Les résultats doivent être enregistrés le plus rapidement possible après l'application de la solution d'arrêt. En effet, en cas de signal élevé, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées.

4. Calcul des résultats

Mesurer les densités optiques des sérums positif et négatif (DO pos et DO nég) ainsi que celles de tous les échantillons (DO échantillons).

Pour chaque échantillon testé et pour le sérum positif, calculer le pourcentage d'inhibition (%inh) en appliquant les formules suivantes :

$$\% \text{ inh échantillon} = [(DO \text{ nég} - DO \text{ échantillon})/DO \text{ nég}] \times 100$$

$$\% \text{ inh positif} = [(DO \text{ nég} - DO \text{ pos})/DO \text{ nég}] \times 100$$

5. Validation du test

Le test ne peut être validé que si les deux conditions suivantes sont remplies :

$$DO \text{ nég} - DO \text{ pos} > 0,7$$

$$\% \text{ inh positif} > 50 \%$$

6. Interprétation des résultats

Déterminer le niveau de positivité des échantillons en utilisant le cut-off suivant :

% inhibition > ou = à 33 % : positif

% inhibition < à 33 % : négatif

ANNEXE 5

ID-Screen *Chlamydophila abortus* Indirect Multi-species

Code produit: CHLMS-MS, N° de lot: 368

1. Principe du test

Les cupules sont sensibilisées avec de l'extrait antigénique spécifique de *Chlamydophila*. Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les cupules. Les anticorps spécifiques de *Chlamydophila*, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps.

Après lavage, un conjugué anti-multi-espèces marqué à la peroxydase (Po) est distribué dans les cupules. Il se fixe aux anticorps, formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-Po. Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB). La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester :

- En présence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage
- En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration.

La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.

2. Composants du kit

<u>Réactifs</u>	<u>Quantité</u>
Microplaques sensibilisées avec un peptide de <i>Chlamydophila abortus</i>	2
Contrôle positif	0.5 ml
Contrôle négatif	1 ml
Tampon de dilution 13	60 ml
Conjugué concentré 10 X	3 ml
Tampon de dilution 3	60 ml
Solution de lavage concentrée 20 X	60 ml
Solution de révélation	60 ml
Solution d'arrêt	60 ml

3. Matériel nécessaire mais non fourni avec le kit

1. Pipette de précision mono ou multicanaux capables de délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl, 200 µl.
2. Embouts de pipette à usage unique.
3. Lecteur de microplaques à 96 puits.
4. Eau distillée ou désionisée.
5. Système de lavage manuel ou automatique.

4. Préparation des échantillons

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

5. Préparation de la solution de lavage

Si nécessaire, ramener la solution de lavage concentrée (**20X**) à température ambiante ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux.

Préparer la solution de lavage (**1X**) par dilution au $1/20^{\text{ème}}$ de la solution de lavage (**20X**) dans de l'eau distillée/désionisée.

6. Mode opératoire

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

1. Distribuer 90 µl de **tampon de dilution 13** dans chaque puits.
2. Distribuer :
 - 10 µl de **contrôle négatif** dans les cupules A1 et B1.
 - 10 µl de **contrôle positif** dans les cupules C1 et D1.
 - 10 µl de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes.
3. Incuber **45 min \pm 4 min** à **21°C (\pm 5°C)**.
4. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de **Solution de lavage**. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
5. Préparer le **Conjugué 1X** en diluant le **Conjugué 10x** au $1/10^{\text{ème}}$ en **Tampon de dilution 3**.
6. Distribuer 100 µl de **Conjugué 1X** dans chaque cupule.

7. Incuber **30 min ± 3 min** à **21°C (±5°C)**.
8. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de **Solution de lavage**.
9. Distribuer 100 µl de **Solution de révélation** dans chaque cupule.
10. Incuber **15 min ± 2 min** à **21°C (±5°C)** à l'obscurité.
11. Distribuer 100 µl de **Solution d'arrêt** dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
12. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

7. Validation du test

Le test est validé si :

- ✓ la valeur moyenne de densité optique des contrôles positifs (DO_{CP}) est supérieure à **0.350**.

$$DO_{CP} > 0.350$$

- ✓ le rapport entre la moyenne des contrôles positifs (DO_{CP}) et la moyenne des contrôles négatifs (DO_{CN}) est supérieur à 3.

$$DO_{CP} / (DO_{CN}) > 3$$

8. Calcul et interprétation des résultats

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage S/P :

$$S/P = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{CP}} \times 100$$

Les échantillons présentant un S/P:

- Inférieur ou égal à 50 % sont considérés comme négatifs.
- Compris entre 50 % et 60 % sont considérés comme douteux.
- Supérieur ou égal à 60 % sont considérés comme positifs.

Résultat	Statut
$S/P \leq 50\%$	NEGATIF
$50\% < S/P < 60\%$	DOUTEUX
$S/P \geq 60\%$	POSITIF

ANNEXE 6

**QUESTIONNAIRE DU STATUT SANITAIRE ET GESTION DES ELEVAGES OVINS DE LA WILAYA
DE CONSTANTINE**

Date:

1. N° du Cheptel : (réservé à l'enquêteur) :
2. Commune:.....
3. Nom de l'éleveur :
4. Adresse:
5. Numéro de téléphone :
6. Statut juridique de l'exploitation : Privé Etatique
7. Date de création de l'exploitation : .. / .. /
8. Spéculation: Bovin Ovin Caprin
9. Effectif au .. / .. /

Catégories	Brebis	Antenaises	Agnelles
Effectif			

10. Race :
11. N° d'identification de la brebis :
12. Age de la brebis : 12-23 mois 24-35 mois 36-47 mois 48-59 mois
13. Nombre de mise bas :
14. Source de la brebis: Née dans la ferme Achetée du marché local
15. Vaccination contre la chlamydieuse Oui Non
16. Vaccination contre la brucellose Oui Non
17. Vaccination contre la clavelée Oui Non
18. Vaccination contre l'entérotaxémie Oui Non

-
19. Vaccination contre la Fièvre Q Oui Non
20. Date de la dernière mise bas :
21. La mise bas était : Eutocique Dystocique
22. Problèmes de rétention placentaire > 12 heures ? Oui Non
23. Problèmes de mortinatalités ? Oui Non
24. Problèmes d'avortements ? Oui Non
25. Est-ce que c'est des avortements en première gestation ? Oui Non
26. Quel est le stade de gestation lors d'avortement ? 1^{er} trimestre 2^{ème} trimestre Préciser ___^{ème} mois
27. Traitement anti-abortifs ? Oui Non
28. Type de traitement utilisé pour stopper les avortements oxy Oxy-sulfa
29. Est-ce que le diagnostic de laboratoire de l'étiologie d'avortement a été réalisé ? Oui Non
30. Quels sont les signes associés à l'avortement ?
- a. Fièvre et baisse de l'état général suite à l'avortement Oui Non
 - b. Anémie Oui Non
 - c. Troubles nerveux Oui Non
 - d. Ictère Oui Non
 - e. Entérite Oui Non
 - f. Nécrose placentaire Oui Non
 - g. Fœtus momifié Oui Non
31. Mammite Oui Non
32. Arthrite Oui Non
33. Infécondité Oui Non
34. Métrite Oui Non
35. Date de la dernière introduction d'animaux achetés avant fusion avec le troupeau : ___ / ___ / _____
36. Achat à l'extérieur : < 20 animaux/an > 20 animaux/an
37. Est-ce que les animaux achetés souffraient de pathologies ? Oui Non
38. Est-ce que vous traitez les animaux achetés avant fusion avec le troupeau ? Oui Non
39. Quelles sont les pathologies les plus fréquemment observées chez les brebis ?
40. Taux de mortalité chez les jeunes (nb mortalités/nb total des jeunes) :
41. Visiteurs de la ferme vétérinaires ouvriers de fermes voisines Tout
42. Les ouvriers de la ferme visitent-ils les exploitations voisines? Oui Non

-
43. **Fait-on la désinfection du bâtiment ?** Oui Non
44. **Fréquence de la désinfection** une fois par semaine une fois par mois une fois par trimestre une fois par semestre
une fois par an Autre :
45. **Quels sont les produits désinfectants employés ?**
46. **Est-ce que les ouvriers utilisent des vêtements spéciaux pour la ferme ?** Oui Non
47. **Distribution d'ensilage (herbe, maïs) ?** Oui Non
48. **Ration équilibrée (fourrage, céréales, complément azoté) ?** Oui Non
49. **Distribution régulière de minéraux (Ca & P) ?** Oui Non
50. **Est-ce que l'aliment est préparé dans la ferme ?** Oui Non
51. **Est-ce que le concentré est acheté du marché local ?** Oui Non
52. **Existe-t-il un défaut de conservation des fourrages dans votre élevage (moisissures, ensilage trop sec) ?** Oui Non
53. **Quelle est la source de l'eau de boisson ?** Réseau Puits ou forage Réserve en surface Eau de rivière
54. **Circulation d'espèces domestiques ou nuisibles dans les bâtiments ?** Chiens Chats Rats Oiseaux Tout
55. **Existe-t-il un local de mise bas ?** Oui Non
56. **Problèmes de mortinatalité dans la ferme** Oui Non
57. **Maladies infectieuses ou parasitisme connue dans l'élevage : préciser _____ Depuis quand ?**
Année _____
58. **Mode de reproduction** Naturel Artificiel
59. **Date de début des avortements : .. / .. / Nombre d'avortements à ce jour (ou mortinatalités)**
60. **Quel est le nombre de femelles ayant avorté ?** sur (nombre total des femelles dans le troupeau)
61. **Taux avortements/mise bas= nombre de femelles ayant avorté/nb femelles ayant mis bas=**
62. **Age des femelles ayant avorté** Jeunes (< 2 ans) Agées (> 5 ans) Tout âge
63. **Est-ce que c'est des avortements répétés ?** Oui Non
64. **Agneaux chétifs à la naissance** Oui Non
65. **Septicémie chez les jeunes** Oui Non

ANNEXE 7**MATERIEL ET PRODUITS CHIMIQUES EMPLOYES POUR LE
PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS FŒTAUX ET LA
CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *Chlamydia abortus***

Pour les besoins en autopsie des fœtus et en PCR, le matériel utilisé est le suivant :

- Blouse à usage unique.
- Gants à usage unique.
- Masque nasobuccal.
- Lunettes de protection.
- Scalpels stériles.
- Seringues stériles.
- Un couteau à extrémité pointue.
- Une paire de ciseaux de dissections.
- Un bistouri à lame stérile.
- Pots en plastique stériles et étanches.
- Micropipettes capable de délivrer des volumes de : 0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl.
- Embouts de pipettes à usage unique.
- Agitateur type vortex.
- Éthanol (96 – 100%).
- Tubes de microcentrifugation pour la lyse et l'élution 1.5 ml ou 2 ml.
- Tubes PCR eppendorf 0.2 ml ou 0.5 ml translucide.
- Plaque de travail pour tubes PCR (96 x 0.2 ml).
- Microcentrifugeuse avec rotor pour microtubes de 1.5 ml et 2 ml.
- Bain marie.
- Balance analytique (KERN).
- Thermocycleur (Genpro, BIOER).
- Thermomixeur (Mixing block M6-102, BIOER).
- Congélateur à – 20° C.
- Hotte à irradiation UV pour PCR à flux laminaire horizontal et vertical (ESCO).

- Système d'imagerie comportant une caméra à lampe UV en liaison avec un ordinateur et muni d'une imprimante (AlphaDigiDoc[®] RT, Alpha Innotech).
- Cuve d'électrophorèse horizontale.
- Transilluminateur pour électrophorèse.
- Four à micro-ondes.
- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) (Bio Basic Inc[®]).
- Agarose.
- Eau distillée.
- DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen[®]).
- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega[®], USA).
- Marqueur de taille moléculaire (DNA-ladder) 100-1000 bp (Bio Basic Inc[®]).
- Bromure d'éthidium.

ANNEXE 8

**SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES ESPECES DE *Chlamydiaeae*
EMPLOYEES DANS L'ALIGNEMENT**

C. abortus jordan

TCCTCGCGCTAaCTAGTATGGCGAGTTCATTTGCCAGCGGGAAGATAGAGGCCGCTGCTGCAGAGTCTCTT
GCTACAAGATTCATTGCCAGTACCGAAAACCTCAAATGACAATGTTTTGCAAGCAACAGCCAAGAAAGTTAG
ATTTGGTCGTAACAAAAATCAAAGACAAGAACAAAAACATACTGGCGCTTTCTGTGATAAAGAATTTTATC
CTTGCGAAGGTGGTTCAGTGCCAATCCGTCGATACTACACAAGAATCTTGCTACGGCAAAAATGTATTGTGTC
CGTGTTAACGATGACTGTAACGTGGAAATTAGCCAAGCTGTACCTGAATATGCAACAGTAGGATCTCCTTA
TCCTATTGAAATTCCTTGCTGTAGGTAAGAAAGATTGCGTTAATGTTGTGATCACTCAACAACCTCCTTGCG
AAGTTGAGTTTGTGTCAGCAGTGATCCTGCGACAACACCAACCTCAGATAGCAAATTAATCTGGACAATTGAT
TGCTTAGGTCAAGGTGAAAAATGCAAAATTACCGTTTGGGTAA

C. abortus FAS strain

CAAACCTCATCAGACGAGTAGTTACGGTCCCTCGCGCTAACTAGTATGGCGAGTTCATTTGCCAGCGGGAAGA
TAGAGGCCGCTGCTGCAGAGTCTCTTGCTACAAGATTTCATTGCCAGTACCGAAAACCTCAAATGACAATGTT
TTGCAAGCAACAGCCAAGAAAGTTAGATTTGGTCGTAACAAAAATCAAAGACAAGAACAAAAACATACTGG
CGCTTTCTGTGATAAAGAATTTTATCCTTGCGAAGGTGGTTCAGTGCCAATCCGTCGATACTACACAAGAAT
CTTGCTACGGCAAAAATGTATTGTGTCCGTGTTAACGATGACTGTAACGTGGAAATTAGCCAAGCTGTACCT
GAATATGCAACAGTAGGATCTCCTTATCCTATTGAAATTCCTGCTGTAGGTAAGAAAGATTGCGTTAATGT
TGTGATCACTCAACAACCTCCTTGCGAAGTTGAGTTTGTGTCAGCAGTGATCCTGCGACAACACCAACCTCAG
ATAGCAAATTAATCTGGACAATTGATTGCTTAGGTCAAGGTGAAAAATGCAAAATTACCGTTTGGGTAAAA
CCTCTTAAAGAAGG

C. muridarum outer membrane protein

GGGATTCTTTGGGAAGGTTTTCGGTGGAGATCCTTGCGATCCTTGCAACAACCTGGTGTGATGCCATCAGCCT
ACGTCTCGGCTACTATGGGGACTTCGTTTTTTGATCGTGTGTTTTGAAAACAGACGTGAACAAACAGTTCGAAA
TGGGAGCAGTCTCTACAGGAGATGCAGACCTTACTACAGCACCTACTCCTGCATCAAGAGAGAATCCCCT
TATGGCAAGCATATGCAAGATGCAGAAATGTACACTAATGCTGCGTTCATGGCTTTAAACATTTGGGACCG
TTTCGATGTATTTTGTACATTGGGAGCAACTAGCGGATATCTTAAAGGTAATTCTGCCGCCTTTAACTTAG
TTGGTCTGTTTGAAGAGATGAAACTGCAGTTGCAGCTGACGACATACCTAACGTCAGCTTGTCTCAAGCT
GTTGTGCAACTCTACACAGACACAGCTTTTCGCTTGAGCGTTCGTTGCTAGAGCAGCTTTATGGGAGTGC GG
ATGTGCAACTTTAGGAGCTTCCCTCCAATATGCTCAATCTAAGCCAAAAGTAGAGGAATTAACGTTCTCT
GTAATGCGGCAGAATTCATTAATAACAAGCCTAAAGGATACGTTGGACAAGAGTTTCTCTTAACATTAAA
GCTGGAACAGTTAGCGCTACAGATACTAAAGATGCTTCCATCGATTACCATGAGTGGCAAGCAAGCTTGGC
TTTGTCTTACAGACTGAATATGTTCACTCCTTACATTGGAGTTAAGTGGTCTAGAGCAAGCTTTGATGCCG
ACACTATCCGCATTGCGCAGCCTAAGCTTGAGACCTCTATCTTAAAAATGACCACTTGGAAACCAACGATC
TCTGGATCTGTTATAGACGTTGATACAAAAATCACGGATACATTACAAATTGTTTCTTGCAGCTCAACAA
GATGAAATCCAGAAAATCTTGCGGTCTTGCAATTGGGACAACAATTGTAGATGCTGATAAATATGCAGTTA
CTGTTGAGACACGACTGATCGAT

C. pecorum omp2

ATTGGGAAAAAAGATGCGTAAATGTTGTTCATCACACAACAACCTTCTTGTGAAGCGGAATTTGTTAGCAG
CGATCCTGAAACTACACCAACCGCAGATGGGAAATTGATGTGGAAAATCGATCGTTTTAGGACAAGGCGAAA
GATGCAAAATTAAGTGTGGGTAAGCCAATAAAGAGGGCTGCTGTTTTTACCGCAGCGACAGTATGTGCA
TGTCCAGAAAATCCGCTCCTACACAAAAATGCGGCCAACCTGCAATTTGTATTAAGCAAGAATGCCCATATTG
CGCATGCCTACGTTGCCCGTACGTTACAAAATCGAAGTAAGCAATACAGGCTCCGCAATTGCTCGTAACG
TTGTTGTAGATAACCCTGTTCCAGACGGATTCTCTCAGCTTCTGGACAAGGGTTCTTTCTTCAACCTC
GGTGATATGCACCCCGGTGAAAGTAAAGTCTTTGTGTGGAATTTTGCCTCAAAAAAGAGGACAAGTGAC

TAATGTGCTACAGTGAGCTATTGTGGAGGCCATAAGTGTCTGCAAACGTCATGACAGTAATTAATGAGC
 CTTGTGTCAATGTCACAATATCTGGAGTTGATTGGGCTTATGTATGCAAACCTGTAGAATACACAATCACA
 GTATCTAACCCCTGGGGATCTCGTTCTCCGTAATGTTGTTGTTGAAGATACCCTTCCTGGATCTGCATTGAT
 CCTAGAAGCTGCAGGTGCAGAAATCTCTTGTAAACAAAGCCGTATGGTGTATCAAAGAACTCTGCCCAGGAG
 AAACCTCTACAGTTTAAAGTATTGGTAAAAGCTCAAGTCCCTGGACAGATCACCAGCCAGGTTGTTGTAAAC
 TCCCAATCTGATTGTGGAGCTTGTACTTCTTGTGCAGATGCAACAACATATTGGAAAGGCTTAGCTGCTAC
 TCACATGTGTGTAATCGATACAAATGACCCTATCTGTGTTGGAGGAAATACAGTATACCCGATTTGTATAA
 CAAACCGTGGTTCTGCAGAAGATACGAATGTTTCTTTAATCCTGAAATTTTCTAAAGAACTTCAACCTATA
 TCTTCTCTGGCCCAACCAAGGAACGATTTCTGGAAATACAGTAATTTTTGATGCCTTACCCAAATTAGG
 TTCAAAAGAATCTGTAGAGTTTTCTGTAACGTTGAAAGGCGTTGCTCCC

C. pneumoniae outer membrane protein 2

ATAGGCCAAAAAGATTGTGTTGATGTTGTGATTACACAACAGCTACCTTGCGAAGCTGAATTCGTAAGCAG
 TGATCCAGAAACAACCTCTACAAGTGATGGGAAATTAGTCTGGAAAATCGATCGCCTGGGTGCAGGAGATA
 AATGCAAAATTAAGTATGGGTAAAACCTCTTAAAGAAGGTTGCTGCTTCACAGCTGCTACTGTATGTGCT
 TGCCAGAGCTCCGTTCTTATACTAAAATGCGGTCAACCAGCCATTTGTATTAAGCAAGAAGGACCTGACTG
 TGCTTGCCTAAGATGCCCTGTATGCTACAAAATCGAAGTAGTGAACACAGGATCTGCTATTGCCCGTAACG
 TAACTGTAGATAATCCTGTTCCCGATGGCTATTCTCATGCATCTGGTCAAAGAGTTCTCTCTTTTAACTTA
 GGAGACATGAGACCTGGCGATAAAAAGGATTTACAGTTGAGTTCTGCCCTCAAAGAAGAGGTCAAATCAC
 TAACGTTGCTACTGTAACCTACTGCGGTGGACACAAATGTTCTGCAAATGTAACCTACAGTTGTTAATGAGC
 CTTGTGTACAAGTAAATATCTCTGGTGCTGATTGGTCTTACGTATGTAAACCTGTGGAGTACTCTATCTCA
 GTATCGAATCCTGGAGACTTGGTTCTTCATGATGTGCTGATCCAAGATACACTCCCTTCTGGTGTACAGT
 ACTCGAAGCTCCTGGTGGAGAGATCTGCTGTAATAAAGTTGTTTGGCGTATTAAGAAAATGTGCCCAGGAG
 AAACCTCCAGTTTAAACTTGTAGTGAAGCTCAAGTTCCTGGAAGATTCACAAATCAAGTTGCAGTAACT
 AGTGAGTCTAACTGCGGAACATGTACATCTTGCAGCAAAAACAACACATTGGAAAGGTTCTGCAGCTAC
 CCATATGTGCGTATTAGACACAAATGATCCTATCTGTGTAGGAGAAAATACTGTCTATCGTATCTGTGTAA
 CTAACCGTGGTTCTGCTGAAGATACTAACGTATCTTTAATCTTGAAGTTCTCAAAGAAGTTTCAAGCCAATA
 GCTTCTTCAAGTCCAACCTAAAGGAACGATTTCAAGTAATACCGTTGTTTTCGACGCTTTACCTAAACTCGG
 TTCTAAGGAATCTGTAGAGTTTTCTGTTACCTTGAAGGATTTGCTCCC

C. psittaci

ATGGCGAGTTCATTTGCCAGCGGGAAGATAGAGGCCGCTGCTGCAGAGTCTCTTGCTACAAGATTCATTGC
 CAGTACTGAAAACGCAGATGACAATGTTTTTCAAGCAACAGCCAAGAAAGTTAGATTTGGTGTAAACAAA
 ATCAAAGACAAGAACAAAACATACTGAAGCTTCTGTGATAAAGAATTTTATCCTTGTGAAGGTGGCCAG
 TGCCAACCAGTAGACGCTACACAAGAATCTTGCTACGGCAAAAATGTATTGTGTCCGTGTTAACGATGACTG
 TAACGTTGAAATCAGCCAATCTGTACCTGAATATGCAACAGTAGGATCTCCTTATCCTATTGAAATTTCTCG
 CTGTAGGTAAGAAAGATTGCGTTAATGTTGTGATTACTCAACAGCTTCCTTGCAGAGTTGAGTTTGTGAGC
 AGTGATCCTGCGACAACACCAACCTCGGATAGCAAAATTAATCTGGACAATTGATCGCTTAGGTCAAGGTGA
 AAAATGCAAAATTACCGTTTGGGTAAAACCTCTTAAAGAAGGTTGTTGCTTCCCGCGGCTACTGTATGTG
 CTTGCCAGAACTTCGCTCTTATACCAAATGCGGACAACCAGCTATTTGTATTAAGCAAGAAGGTCCTGAA
 TGCGCTTGCTTACGTTGCCAGTTTGTACAAAATCGAAGTTTGAACACAGGTTCTGCTATAGCCCGTAA
 TGTTGTGCTCGATAAACCAGTTCCCGATGGCTATACTCATGCTTCAGGACAACGCGTTCTTTCCTTTAACT
 TAGGAGATATGCGTCCCTGGGATTTCTAAATGCTTCTGTGTGGAGTTTTGCCACAAAAAGAGGAAAAGTT
 ACTAACGTGGCTACTGTATCTTACTGCGGAGGACATAAATGTTCTGCTAACGTAACCTACTGTAGTTAACGA
 ACCATGCGTACAAGTAAATATCTCTGGAGCTGACTGGTCTTATGTATGTAAGCCTGTAGAATACACTATCG
 TTGTATCTAACCCAGGAGATCTTAAACTTTACGATGTAGTTATAGAAGATACCGCACCTTCAAGGCAACA
 ATTTTAGAAGCTGCTGGAGCTGAAATCTGCTGTAACAAAGCTGTATGGTGCATCAAAGAAAATGTGCCCAGG
 AGAGACTCTTCAATTTAAAGTTGTGGCTAAAGCACAAAGCCCAGGTAAATTCACAAATCAAGTTGTTGTCA
 AAATAACTCCGATTGTGGAACCTGTACTTCTTGCAGCAAGTTACAACACATTGGAAAGGTTCTGCAGCT
 ACGCATATGTGCGTAATCGATACCAATGATCCTATTTGCGTAGGAGAAAATACTGTATACCGTATTTGTGT
 AACCAACCGTGGTTCTGCAGAAGATACGAACGTTCTGTTAATCCTTAAGTTTTCTAAGGAAGTACAACCCG
 TTTCTTCTTCAAGTCCAACAAAAGGAACCATACAGGGAATACAGTAGTATTGATGCTCTACCTAAATTA
 GGTCTAAGGAATCTGTAGAGTTTTCTGTAACATTAAGGAATGCTCCAGGAGATGCTCGAGGAGAGGC
 TATTCTTCTTCAAGACTCTAACGGTACCTGTTGCTGATACAGAAAACACACATGTTTATTA

C. suis outer membrane protein 2

GACGATCTTCGCGGTGACTAGTGTGGCGAGTTTATTTGCTAGCGGGGTGTTAGAGACCTCTATGGCAGAGT
 CTCTCTCTACAAACGTTATTAGCTTAGCTGACACCAAAGCGAAAAATACTGCTTCTAATCACAAAGACAAA
 AAAGCAAGAAAAAATCATCAAAAAGAACTCCTGTAGTCCATAACCAGGCGGTTGCTCCAGTTCGGGAGTC
 TAAATCTACTGGTCCATAACAGGATTCCTTGCTTTGGCAAAATGTACACCGTCAAAGTTAATGACGATCGTA
 ATGTAGAAATCACGCAGTCTGTTCTGAATATGCTACGGTAGGATCTCCTTATCCTATTGAGATCACTGCT
 AAAGGAAAAAGAGACTGTGTTGATGTCATCATTACACAGCAATTACCTTGCGAAGCAGAGTTCGTTAGTAG
 CGATCCAGCTACAACCTACTGCTGACGGTAAGCTAGTTTGGAAAATTGATCGGTTAGGACAAGGCGAAG
 AAAGTAAAATTACTGTATGGGTAAAACCTCTTAAAGAAGGCTGCTGTTTTACTGCTGCAACGGTTTTGTGCT
 TGTCCAGAGATTGTTTCGGTTACAAAATGTGGTCAGCCTGCAATCTGCGTTAAACAGGAAGGTCCTGAATG
 CGCATGTTTTCGTTGCCCTGTAACCTACAAAATTCTCGTAGTTAACCAAGGAACAGCGACAGCTCGTAACG
 TTGTGCTAGAAAATCCTGTTCCGGATGGCTTTGCTCACTCATCTGGACAGCGTGTGTTGACATACACCCTA
 GGGGATATGCAACCTGGAGAACAGAAAAGTAGTCACTGTTGAGTTTTCGCCCTCTTAAACGCGGGCGAGCTAC
 AAACATCGCGACAGTTTTCTTACTGTGGTGGCCATAAAAATACGGCTAGCGTAACAACGGTAATCAATGAGC
 CTTGCGTACAAGTAAATATCGCTGGAGCTGATTGGTCTTACGTTTGTAAACCTGTAGAATATGTGATCTCT
 GTTTTCTAATCCTGGAGATCTGATTTTACGAGACGTTGTAGTCGAAGATACACTTTTCTCCTGGAGTAACTGT
 CATTGAGGCACCTGGAGCTCAAATTTCTTGTAAATAAAGTAGTTTGGACTGTGAAAGAACTCAATCCTGGAG
 AATCCCTGCAATATAAAGTTTTAGTAAGAGCACAACTCCTGGGCAATTTACAAATAACGTCGTTGTGAAA
 AGCTGCTCCGATTGCGGTACTTGTACATCTTGCAGAGGCAACAACCTTACTGGAAGGGGTTGCTGCGAC
 TCACATGTGTGTAGTTGATACCTGTGATCCGGTTTTCGCTAGGGGAAAATACTGTTTATCGCATCTGTGTGA
 CAAACAGAGGGTCTGCAGAAGACACTAATGTTTCTTAAATCTTGAAATTTCTTAAAGAATTGCAACCAGTA
 TCCTTCTCTGGGCCAACTAAAGGAACAATTACAGGCAATACGGTAGTGTGTTGATGCGTTACCTAGATTAGG
 TTCTAAAGAAA

C. trachomatis outer membrane protein 2

TAAAAGTTAGTTAATAACAATTTCTACCCGATGGCAGACAAAAATAATCTATGCGAATAGGAGATCCTAT
 GAACAACTCATCAGACGAGCAGTGACGATCTTCGCGGTGACTAGTGTGGCGAGTTTATTTGCTAGCGGGG
 TGTTAGAGACCTCTATGGCAGAGTTCACCTCTACAAACGTTATTAGCTTAGCTGACACCAAAGCGAAAGAC
 AACACTTCTCATAAAAGCAAAAAAGCAAGAAAAACCACAGCAAAGAGACTCTCGTAGACCGTAAAGAGGT
 TGCTCCGGTTCATGAGTCTAAAGCTACAGGACCTAAACAGGATTCCTTGCTTTGGCAGAATGTATACAGTCA
 AAGTTAATGATGATCGTAATGTTGAAAACACACAAGCTGTTCCCTGAATATGCTACGGTAGGATCTCCCTAT
 CCTCTTGAAAATTACTGCTACAGGTAAAAGGGATTGTGCTGATGTTATCATTACTCAGCAATTACCATGTGA
 AGCAGAGTTTCGTACGCAGTGATCCAGCGACAACCTCTACTGCTGATGGTAAGCTAGTTTGGAAAATTGACC
 GCTTAGGACAAGGCGAAAAGAGTAAAATTACTGTATGGGTAAAACCTCTTAAAGAAGGTTGCTGCTTTACA
 GCTGCAACAGTATGCGCTTGTCCAGAGATCCGTTTCGGTTACAAAATGTGGACAACCTGCTATCTGTGTTAA
 ACAAGAAGGCCAGAGAATGCTTGTGTTGCGTTGCCAGTAGTTTACAAAATTAATGTAGTGAACCAAGGAA
 CAGCAATAGCTCGTAACGTTGTTGTTGAAAATCCTGTTCCAGATGGTTACGCTCACTCTTCTGGACAGCGT
 GTACTGACGTTTACTCTTGGAGATATGCAACCTGGAGAGCACAGAACAATTACTGTAGAGTTTGTCCGCT
 TAAACGTGGTTCGTGCTACCAATATAGCAACGGTCTCTTACTGTGGAGGACATAAAAATACAGCAAGCGTAA
 CAACTGTGATCAATGAGCCTTGCCTACAAGTAAGTATTGCAGGAGCAGATTGGTCTTATGTTTGTAAAGCCT
 GTAGAATATGTGATCTCCGTTTCCAATCCTGGAGATCTTGTGTTGCGAGATGTCGTCGTTGAAGACACTCT
 TTCTCCCGAGTACAGTTCCTTGAAGCTGCAGGAGCTCAAATTTCTTGTAAATAAAGTAGTTTGGACTGTGA
 AAGAACTGAACTCCTGGAGAGTCTCTACAGTATAAAGTTCTAGTAAGAGCACAACTCCTGGACAATTCACA
 AATAATGTTGTTGTGAAGAGCTGCTCTGACTGTGGTACTTGTACTTCTTGCAGAGAAGCGACAACCTACTG
 GAAAGGAGTTGCTGCTACTCATATGTGCGTAGTAGATACTTGTGACCCGTTTTGTGTAGGAGAAAATACTG
 TTTACCGTATTTGTGTCACCAGCAGAGGTTCTGCAGAAGATACAAATGTTTCTTTAATGCTTAAATTTCTCT
 AAAGAACTGCAACCTGTATCCTTCTCTGGACCAACTAAAGGAACGATTACAGGCAATACAGTAGTATTCGA
 TTCGTTACCTAGATTAGGTTCTAAAGAACTGTAGAGTTTTCTGTAACATTGAAAGCAGTATCAGCTGGAG
 ATGCTCGTGGGAAGCGATTCTTCTTCCGATACATTGACTGTTCCAGTTTCTGATACAGAGAATACACAC
 ATCTATTAATCTTTGATTTTAT

C. caviae omp2

GAAGATAGAGGCCGCTGCTGCAGAGTCTCTTGCTACAAGATTTATTGCTAGTGCTGAAAACTCAGATGACA
 ATATTTTCGCAGAGAAAAGCCAAGAAAAGTTAGATTTGGTTCGTAATAAATATCAAAAAACAAGAACAAAAAAT
 AATGGCCCTTACTGTGATAAAGAATTTTATCCGTGTCAAGATGGCTCATGCCAATCATCAGTAGATACTAA
 GCAAGAACCTTGCTACGGCAAAAATGTATTGCGTACGTGTTAGCGATGATAGTAACGTTGAAATTAGCCAAG
 CTGTACCTGAATATGCAACAGTAGGATCTCCTTATCCTATTGAAATTCCTTGCTGTAGGTAAAAGAGATTGC
 GTTAATGTTGTTATCACTCAACAGCTTCCTTGCGAAGTTGAATTCATAAGCAGCGATCCTGCGACAACACC
 TACTTCCGATAGTAAATTAATTTGGACAATTGATCGCTTAGGTCAAGGTGAAAGATGCAAAAATTACTGTTT
 GGGTAAAACTCTTAAAGAAGGTTGCTGCTTACAGCTGCTACCGTATGTGCTTGCCAGAACCTTCGCTCT
 TATACCAAATGCGGACAACCTGCTATTTGCATTAAGCAAGAAGGCCCTGAGTGCCTTGCTTACGTTGCC
 AGTTTGTACAAAATCGAAGTTACCAACACAGGTTCTGCTATAGCCCGTGGTGTGTGGTTGATAACCCAG
 TACCCGATGGGTATTCTCACCTTCAGGACAACGCGTTCTTTCTTTAACTTAGGAGATATGCGTCTGGT
 GATACAAAATGCTTCACTGTAGAGTTTTGCCCTCAAAAAAGAGGAAAAATTACCAACGTTGCTACTGTATC
 TACTGCGGTGGACATAAGTGTTCGCTAACGTAACACTGTAATCAACGAGCCTTGCGTACAAGTAAATA
 TCTCCGAAAATGACTGGTCTTACGTATGTAAGCCTGTAGAGTACACCATTGTTGTATCTAACCCAGGGGAT
 CTTAAACTTTACGATGTTGTTATAGAAGATTTAATCCCATCAGGAATTACAATTTTAGAAGCTCCTGGTGC
 TGAGATCTGCTGTAACAAAGCTGTATGGTGCATTAAGAGATGTGTCCAGGAGAACTCTTCAATTTAAAG
 TTGTTGCTAAAGCTCAAACCCAGGCAAATTTACAAATCAAGTTCCGTAAAAACAACCTCTGATTGTGGA
 TCTTGCCTTCTTGCGCAGAAGTTACAACCTATTGGAAGGTCTCGCAGCTACCCATATGTGCGTAATTGA
 TACCAATGATCCTATTTGCGTAGGTGAAAATACTGTATAACCGTATTTGCGTAACCAACCGTGGTTCTGCAG
 AAGATACTAACGTCCTGTTAATCCTTAAGTTTTCTAAGGAATTACAACCCGTTTCTTCTTCGGGTCCAACA
 AAAGGAACCAATTACAGGTAATACAGTAGTATTCGATGCTTTACCTAACTAGGTTCTAAGGAATCTGTAGA
 GTTTTCCGTAAACATTGAAAGGAGTTGCTCCTGGAGATGCCCGGAGAAGCTATTCTTCTTCAGATACTT
 TAACAGTACCTGTAGCAGATACGGAAAAACACACACGTTTATTAA

Chlamydomphila felis outer membrane protein OmpA

AAGAAAAGATACTATGCATAATCTTTAGAGGTGAGTATGAAAAACTCTTAAAATCGGCATTATTATTTGC
 CGCTGCGGGTTCGCTCTCTCCTTACAAGCCTTGCCCTGTAGGGAAATCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCG
 ATGGCACTATGTGGGAAGGTGCTTCAGGAGATCCTTGTGATCCTTGTGCTACTTGGTGTGATGCTATCAGC
 ATCCGTGCAGGATTCTACGGAGATTATGTTTTCGATCGTATATTAAGTTGATGTTAATAAAACCATCAG
 CGGAATGGCTGCGGCTCCAACAGCAGCTTCTGGAAGTGAAGCAACACCCTGTGCTGCCGACAGATCAA
 ATTTTGCTACGGCAAACATCTTCAAGATGCCGAATGGTGCACCAATGCTGCTTACTTAGCATTAAATATT
 TGGGATCGTTTTGATGTTTTCTGCACGCTAGGAGCGTCTAATGGTTACTTCAAAGCAAGTTCTGATGCATT
 TAACCTTGTGCGATTGATTGGTCTTGCAGGAAGTGAATTCGCCAATCAGCGTCCAACGTTGAAATTTCTC
 AAGGCATTGTAGAGCTATACACAGATACCGCATTTTCTTGAGCGTTGGTGTCTCGCGGAGCTTTGTGGGAA
 TGTGGTTGTGCAACTTTGGGAGCTGAATTCGAATATGCTCAATCCAATCCTAAAATTGAAATGCTCAATGT
 AACCTCTAGCCCAGCACAAATTCATGATACACAAGCCTAGAGGATACAAAGGGACTGCAGCAAACCTTCCCCT
 TACCTGTAGCAGCTGGCACAGCAACTGCAACAGATACTAAATCAGCTACTGTAAAGTACCATGAATGGCAA
 GTAGGATTGGCTCTTTCATACAGATTGAACATGCTTGTTCATACATTGGGGTAAATTTGGTCAAGAGCTAC
 TTTTCGATGCTGACACTATCCGCATTGCTCAACCTAAATTTGGCCTCAGCAATCCTAAACTTAACAACCTGGA
 ACCCAACTCTTTTAGGAGTGGCCACAACCTTTAGACACCTCCAACAAATATGCTGACTTCATGCAAATCGTT
 TCTATGCAAATCAACAAGATGAAGTCTAGAAAAGCTTGTGGTATGCTGTTGGAGCAACTTTAATCGACGC
 TGATAAATGGTCCATTACTGGTGAAGCACGCTTAATCGACGAAAGAGCTGCTCACATTAATGCTCAATTCA
 GATTCTAAGGATTTAGTTTA

Résumé

Résumé

L'AVORTEMENT ENZOOTIQUE DES BREBIS : Séroprévalence et caractérisation moléculaire de *Chlamydia abortus* dans la wilaya de Constantine

HIRECHE Sana

L'avortement enzootique des brebis est la pathologie abortive la plus redoutée des éleveurs du fait des pertes économiques importantes et du risque zoonotique. L'objectif de cette étude est de déterminer la séroprévalence, les facteurs de risque associés à l'infection chlamydienne et de caractériser *C. abortus* sur un plan moléculaire par PCR-RFLP et séquençage d'ADN extrait des tissus fœtaux et placentas. Une étude transversale a été conduite entre mars 2011 et janvier 2012 dans les 12 communes de la wilaya de Constantine. Un dépistage sérologique de cinq agents abortifs est réalisé sur un effectif de 226 sérums et 39 élevages ovins. Les techniques d'ELISA et de séroagglutination ont été employées pour la recherche des anticorps dirigés contre *Chlamydia* spp., *Coxiella burnetii*, *Salmonella abortus ovis*, *Neospora caninum* et *Brucella melitensis*. Un questionnaire pré-testé a été délivré aux éleveurs afin de renseigner sur le statut sanitaire et les modalités de gestion des élevages. Les résultats démontrent la prédominance de la chlamydie (45,5 %) et de la fièvre Q (12,4 %) et soulignent une poly-infection des troupeaux étudiés qui ne possèdent pas le même statut immunitaire envers les agents abortifs recherchés. La taille de l'échantillon a été augmentée à 552 brebis et 54 troupeaux. 24,5 % des brebis sont séropositives à *Chlamydia* spp. et 70,4 % des cheptels possèdent au moins une brebis séropositive. L'analyse par régression logistique définit le jeune âge (12 à 23 mois) et le non usage des désinfectants comme facteurs de risque. Une corrélation significative est notée entre l'infection chlamydienne, les mortinatalités et les mortalités chez les jeunes agneaux. Par contre, la disponibilité des services vétérinaires semble intervenir comme facteur protecteur contre l'infection. Les anticorps vis-à-vis de *C. abortus* sont détectés dans 7,2 % des sérums. 33,3 % des élevages contiennent au moins une brebis séropositive à *C. abortus*. Les visites d'ouvriers de fermes voisines constituent un facteur de risque. La naissance d'agneaux chétifs et les septicémies chez les agneaux sont fortement corrélées à l'avortement enzootique des brebis. L'étude moléculaire sur 104 prélèvements de tissus fœtaux et placentas de brebis avortées prouve l'infection par *C. abortus* de 4 placentas et 26 échantillons fœtaux. La séquence nucléotidique partielle de similarité matrix du gène omp2 montre que les isolats algériens possèdent 96 % de similarité avec la souche FAS de *C. abortus* et 84,3 % de similarité avec la souche *C. caviae* tandis qu'une similarité faible avec les autres espèces du genre *Chlamydia* est notée. L'analyse histologique des placentas positifs par PCR révèle une placentite sévère.

Mots clés : Avortements infectieux, brebis, *Chlamydia abortus*, séroprévalence, facteurs de risque, caractérisation moléculaire, placentite.

ملخص

الإجهاض المستوطن في الأغنام:

نسبة الانتشار والتوصيف الجزيئي للكلاميديا المجهضة عند النعاج في ولاية قسنطينة

حيرش سناء

تؤدي مسببات الإجهاض المعدية إلى خسائر اقتصادية معتبرة في تربية المواشي بالإضافة للمخاطر الصحية التي يمكن للإنسان أن يتعرض لها. تم جمع 226 عينة دم من النعاج و إخضاعها لمجموعة من التحاليل المصلية و ذلك لأجل تحديد نسب الأجسام المضادة لخمسة ميكروبات مسببة للإجهاض، منها البكتيرية (داء البروسيلة، داء الكلاميديا، السالمونيلا المجهضة و أنفلونزا الماعز) والأخرى طفيلية (البوغية الكلبيية الجديدة أو النيوسبور). أثبتت نتائج الدراسة الأولية للأمصال أن الكلاميديا (45,5%) و أنفلونزا الماعز (12,4%) هما الأكثر انتشارا. أجريت دراسة مسحية مصلية للفترة الممتدة بين آذار 2011 و يناير 2012 من أجل تحديد نسبة انتشار وعوامل المخاطرة المرتبطة بالكلاميديا المجهضة بين قطعان الأغنام عبر جميع بلديات ولاية قسنطينة، حيث تم اختيار 552 نعجة تنتمي إلى 54 قطع و ذلك بطريقة عشوائية. كما قد تم تعبئة استبيان يتضمن معلومات وافية عن كل قطع و نعجة. حللت الامصال بواسطة اختبار الإليزا غير المباشر. بعد تجميع البيانات اللازمة أجري تحليلها باستخدام (Chi-square test) و نموذج متعدد الصفات التراجعي اللوجستي لتشخيص العوامل المرتبطة بالإصابة بالكلاميديا المجهضة. بينت الدراسة أن نسبة انتشار مرض الكلاميديا المجهضة قدرت ب 7,2%. وضح نموذج التراجع اللوجستي اثنين من العوامل الرئيسية المرتبطة بالإصابة بمرض الكلاميديا المجهضة وهما الفئة العمرية التي تتراوح بين 12 و 23 شهرا و عدم استخدام المطهرات. كما ارتبطت النتائج المصلية بوقوع الاملاص و موت الخرفان. أما عن العوامل التي تحمي من هذه البكتيريا فان الدراسة بينت أن المصالح البيطرية تساهم في خفض نسبة انتشار الكلاميديا المجهضة. بينت نتائج الدراسة الجزيئية تواجد الحمض النووي *C. abortus* في 4 من 8 مشيمة و في 26 من 104 عينة أعضاء الأجنة التي تم فحصها عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل. سجل التحليل الجزيئي لتسلسل النوكليوتيدات مصفوفة التشابه للجينات omp2 وجود تشابه للعزلة الجزائرية بنسبة 96% مع *C. abortus* FAS و بنسبة 84.3% مع *C. caviae* في حين أن نسب التشابه كانت منخفضة مع بقية الأنواع من جنس الكلاميديا. في الأخير أدى الفحص النسيجي للمشيمة الإيجابية إلى كشف التهاب حاد للمشيمة.

الكلمات المفتاحية: الإجهاض المعدية، الكلاميديا المجهضة، النعاج، نسبة الانتشار، عوامل المخاطرة، الأجنة، التوصيف الجزيئي.

Abstract

ENZOOTIC ABORTION OF EWES: Seroprevalence and molecular characterization of *Chlamydia abortus* in Constantine

Sana HIRECHE

Infectious causes of abortion have been associated with severe economic losses for the livestock and have zoonotic implications. A cross-sectional study is carried out to estimate prevalence of *Chlamydia* spp. antibodies and to investigate risk factors associated with chlamydial infection in 552 ewes between March 2011 and January 2012. A serological screening is conducted to determine prevalence of antibodies against five infectious agents in 226 ewes. ELISA, rapid slide agglutination and slow agglutination techniques are used to detect antibodies against *Chlamydia* spp., *Coxiella burnetii*, *Brucella melitensis*, *Salmonella abortus ovis* and *Neospora caninum*. Antibodies toward *Chlamydia* spp. and *Coxiella burnetii* were the most prevalent. Anti-*Chlamydia* spp. and anti-*C. abortus* antibodies were present in respectively 24,5 % and 7,2 % of examined sera. Of the herds, 70,4 % had at least one seropositive animal for *Chlamydia* spp. and 33,3 % for *C. abortus*. A pretested structured questionnaire was administered in order to collect information on individual animal health and herd management practices. Chi-square analysis and multivariable logistic regression model were used to identify risk factors related to *Chlamydia* spp. and *C. abortus* seropositivity. Multivariable logistic regression model identified 12-23 months age group and not using disinfectants as risk factors for *Chlamydia* spp. seropositivity. Occurrence of stillbirth and 5–10 % mortality rate in young lambs were significantly associated with *Chlamydia* spp. seropositivity. However, availability of veterinary service was identified as a protective factor. The model revealed that foreign farm visitors are a risk factor for enzootic abortion of ewes. Results of this study determined two major variables associated with seropositivity to *C. abortus*; delivery of weak lambs and septicemia in young lambs. Molecular characterization by PCR-RFLP of 104 fetal and placental ovine samples confirmed infection with *C. abortus* in 4 placentas and 26 fetal tissues. The partial nucleotide sequence similarity matrix of omp2 gene showed that the Algerian isolates have 96% similarity with *C. abortus* FAS strain and 84.3 % similarity with *C. caviae* strain while a low similarity the other species of the genus *Chlamydophila* was found. Histological examination of PCR positive placentas revealed a severe placentitis.

Key words: Infectious abortion, *Chlamydia* spp., *C. abortus*, ewes, seroprevalence, risk factors, abortion, stillbirth, molecular characterization, placentitis.