

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEM



185THV-2

UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB
-BLIDA-

FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Docteur vétérinaire

THEME :

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA
BRUCELLOSE BOVINE
(CORRÉLATION ENTRE LA CLINIQUE ET LA SÉROLOGIE)**

Étude dans les régions: M'Chedalah (Bouira) et Tazmalt (Béjaia)

Réalisé par : - MOHAMEDI *Souria*
- BENHAMOUCHE *Aini*

Membres de jury :

- KAIDI Rachid (Professeur à l'université de SAAD DAHLEB)..... Président
- PACHA Bachir Mohamed (MC à l'université de SAAD DAHLEB).....Examineur
- YAHIMI Abd elkrim (CC à l'université de SAAD DAHLEB)Examineur
- MENOUERI Nabil (MA à l'université de SAAD DAHLEB)Promoteur

Date de soutenance : 16/09/2008

Promotion 2008

REMERCIEMENTS

Nous remercions notre promoteur Mr MENOUERI.N d'avoir accepté de diriger notre travail, les docteurs vétérinaires OULEBSIR.L de nous avoir aidés pour la réalisation des prélèvements et leur envoi au laboratoire, BOUDAHA.N et Farida de nous avoir grand ouvert les portes de la DSV de Mchedalah.

Nous remercions Mlle Dihia. S pour ses conseils précieux et Mr AKLOUL.K pour sa compassion.

Nous remercions les bibliothécaires Assia et Ihssane pour leur gentillesse et compréhension.

Nous remercions Mr Gaci Yazid pour sa gentillesse et son aide précieuse

Nous remercions les membres du jury composé du Pr KAIDI Rachid, Dr YAHIMI Abd Elkrim et Dr PACHA Bachir Mohamed d'avoir accepté de juger et d'évaluer notre travail.

Nous remercions le laboratoire régional vétérinaire de Draâ Ben Khedda.

Nous remercions tous les enseignants qui nous ont permis d'atteindre ce niveau, du primaire à l'université et toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce PFE.

DÉDICACES

JE DÉDIE CE TRAVAIL À L'HOMME DE MA VIE..... MON PÈRE

SOURIAM

DÉDICACES

JE DÉDIE CE TRAVAIL À :

MES TRÈS CHERS PARENTS QUI ONT TOUJOURS CRU EN MOI .

MES TRÈS CHÈRES SŒURS : SABIHA, LYNDA, FAIROUZ ET FERIEL.

MON TRÈS CHER MARI RAIDIA QUI N'A JAMAIS CESSÉ DE M'AIDER
AINSI QUE SA FAMILLE.

MES BEAUX FRÈRES: AISSA, DJAFFAR ET DJAMEL.

MES NEVEUX: CHAKER, RAYANE ET SOUHIL.

MES COUSINS ET COUSINES.

TOUS MES AMIS.

LA FAMILLE BENHAMOUCHE DE GUERROUAOU.

LA PROMOTION 2008.

AINI B

LISTE DES TABLEAUX :

Tab I et II : Statistiques sur la brucellose en Algérie 2000-2006 [M.A.D.R 2006] (page6).

Tab III: La diversité d'hôtes pour les différentes espèces de *Brucella* (page 8).

Tab IV : Les principaux caractères culturaux et biochimiques des espèces du genre *Brucella* (page 27)

Tab V : Tableau résumant le diagnostic différentiel entre les maladies abortives chez les bovins [14] (page 40, 41,42).

Tableau VI: Nombre et taux d'avortements et de RP constatés sur l'ensemble des cas suspects (page 55).

Tableau VII : Nombre et taux des cas positifs et des cas négatifs à la sérologie, constatés sur l'ensemble des prélèvements effectués (page 56).

Tableau VIII : Nombre de cas positifs et négatifs relatifs à chacun des deux signes cliniques (page 57). .

Tableau IX : Taux de positivité relatif à chacun des deux signes cliniques (page 58)..

Tableau X : Taux des avortements et des RP positives à la sérologie(5page 59).

LISTE DES FIGURES :

- Figure 1 :** Chronologie de la brucellose (page 3).
- Figure 2 :** Incidence annuelle de la brucellose par 1000 000 population [75] (page 4).
- Figure 3 :** Modèle proposé pour le transport intracellulaire de *B.abortus* dans les cellules non phagocytaires « professionnelle »[3] (page 5).
- Figure 4 :** Le genre *Brucella* (coloration de Gram) [10] (page 9).
- Figure 5 :** *Brucella abortus* au microscope électronique [10] (page 9).
- Figure 6 :** Colonies de *B. melitensis*, [10] (page 10).
- Figure 7 :** Ultra structure du LPS des Brucelles [10] (page 13).
- Figure 8:** répartition des épitopes A et M sur le LPS des espèces de types smooth de *Brucella* (*B.abortus*, *B.melitensis* et *B.suis*) [12] (page 14).
- Figure 9:** Lésion suppurative de type hygroma due aux Brucelles. (Western College of Veterinary Medicine) (page 17).
- Figure 10 :** Orchite due aux brucelles. (Western College of Veterinary Medecine) (page 17).
- Figure11 :** Les enveloppes de fœtus des bovins. (www.didactique.com) (page 28).
- Figure12 :** Photo d'un fœtus bovin et ses enveloppes. (www.didactique.com) (page 29).
- Figure13 :** A : Les caroncules maternelles. B : Les placentômes.
(www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/transport.html) (page 31).
- Figure14 :** A : Photos d'une vache présentant une rétention placentaire. B : délivrance normale d'une vache [40] (page 34).
- Figure 15:** A : schématisation de l'utérus de vache et des mains de l'opérateur lors de délivrance manuelle. B : désengrènement manuelle des cotylédons [40] (page 37).
- Figure16:** Avorton de bovin de 8 mois [19] (page 39).
- Figure 17 :** Diagramme en fromage montrant le taux d'avortements et de RP constatés sur l'ensemble des cas cliniques suspects(page 55).
- Figure 18 :** Diagramme en fromage illustrant le taux de cas positifs et des cas négatifs à la sérologie(page 56).
- Figure 19 :** Histogramme illustrant le nombre et taux de cas positifs par rapport aux cas négatifs relatifs à chacun des deux signes de suspicion de la brucellose(page 57).
- Figure 20 :** Histogramme illustrant le nombre de cas positifs à la sérologie par rapport aux nombre des cas cliniques constatés (page 58).
- Figure 21 :** Diagramme en fromage montrant le taux des avortements et des RP sérologie positive (page59).

LISTE DES ABREVIATIONS :

- Ac** : Anticorps.
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- Ag** : Antigène.
- BBATs**: Buffered *Brucella* antigene tests.
- BPAT**: Buffered plate agglutination test.
- Co₂**: dioxyde de carbone
- C°** : Degré celsius.
- DSV**: Direction des services vétérinaires.
- EAT** : Epreuve à l'antigène tamponné
- EDTA**: Ethylène diamine tétracétate.
- ELISA**: Enzyme liked immuno-sorbent.
- FC**: Fixation de complément.
- Fe**: Fer.
- FPA** : fluorescence polarization assay.
- FSH** : Follicule Stimuling Hormone.
- HCG**: Human Chorionic Gonadotropin.
- HN**: Haptène natif.
- HSR**: Hypersensibilité retardée.
- H₂S**: Hydrogène sulfuré.
- IMC**: Immunité à médiation cellulaire.
- INRA** : Institut national de recherche agricole.
- IV**: Intra veineux.
- K**: potassium.
- KDA**: Kilo Dalton.
- LH**: Luteining Hormone.
- LOV**: Lumière oxygène voltage.
- LPS**: Lipopolysaccharide.
- LPS-S**: Lipopolysaccharide Smooth.
- LPS-R**: Lipopolysaccharide Rough.
- MADR** : Ministère d'agriculture et du développement rural.
- Mg** : Magnésium.
- Na** : Sodium.
- ND** : Non délivrance.
- OPS** : Antigène O du polysaccharide.
- PCR** : Polymerase Chain reaction.

PMSG : Pregnant Mare Serum Gonadotropin ou gonadotropine sérique de la jument gravide.

Poly B : Polysaccharide B.

RB : Rose Bengale.

RID : Radial immunodiffusion.

RAF : Rétention d'arrière faix.

RP : Rétention placentaire.

RT : Ring test.

SAW : Séroagglutination de Wright.

TNF α : Tumor necrosis factor alpha.

UHT: Ultra haute température.

UI: Unité international.

UV : Ultra violet.

Résumé

Dans le but de faire une corrélation entre les deux symptômes de suspicion de la brucellose bovine et les résultats de la sérologie, notre étude s'est effectuée dans les deux Dairas M'chedalah (Bouira) et Tazmalt (Béjaia).

Nous avons réalisé des prises de sang sur des vaches qui ont présenté des avortements au dernier tiers de gestation ou des rétentions placentaires (RP), durant une période allant de Juin 2007 au Mai 2008.

Afin de confirmer ou d'infirmer notre suspicion, nous avons fait appel au laboratoire régional de Draa Ben Kheda.

Sur un total de 21 prélèvements sérologiques, 9 (42.85%) ont été effectués pour motif d'avortement au dernier tiers de gestation et 12 (57.15%) pour motif de RP. Sur le même total de prélèvements, 5 (23.8%) s'avèrent positifs à la brucellose dont 3 se sont manifestés par des avortements et 2 par des RP.

Mots clés :

Brucellose, Zoonose, Bovin, Avortement, Rétention placentaire, Sérologie.

ملخص

من أجل جعل وجود ترابط بين اثنين من أعراض الشك بالحمى المالطية لدى البقر ونتائج الامصال، تمت دراستنا في دائرتي امشدالة (ولاية البويرة) وتازمالت (ولاية بجاية).

قمنا بنزع الدم لدى البقرات اللواتي أجهضن أو ابقين على المشيمة، خلال الفترة الممتدة من جوان 2007 إلى ماي 2008.

من أجل تأكيد أو نفي الشك بالمرض، استعنا بالمخبر الجهوي لذراع بن خدة.

من بين مجموع 21 عينة مصلية، أجريت 9 (42,85%) لسبب الإجهاض في الثلث الأخير من الحمل و12 (57,15%) لسبب الإبقاء على المشيمة. من خلال هذه التحاليل، تم التأكد من صحة المرض عند 5 (23,8%) بقرات، حيث 3 منها أجهضن و2 ابقين على المشيمة.

الكلمات الرئيسية:

الحمى المالطية، الإجهاض، البقر، الإبقاء على المشيمة، الامصال

Summary

In order to make a connection between symptoms of bovine brucellosis suspicion and serology results, our study was made in two Dairas: M'chedalah (Bouira) and Tazmalt (Bejaia).

We carried out blood samples from cows that have submitted abortions or placental retention (PR), during a period from June 2007 to May 2008.

In order to confirm or deny our doubt, we appealed the regional laboratory Draa Ben Kheda.

Of a total of 21 samples serology, 9 (42.85%) were made for reasons of abortion in the last third of gestation and 12 (57.15%) for reasons of retained placenta. On the same total, 5 (23.8%) were positive for brucellosis, in which 3 were revealed by abortions and 2 with retained placenta.

Keywords:

Brucellosis, Zoonosis, Bovin, Abortion, retained placenta, Serology.

SOMMAIRE :

Remerciements.....	I
Dédicaces.....	II
Liste des tableaux	III
Liste des figures	IV
Liste des abréviations	V
Résumé	VI
Introduction	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE (I) : LA BRUCELLOSE BOVINE

I- DEFINITION	2
II- HISTORIQUE	2
III- REPARTITION GEOGRAPHIQUE.....	3
IV- IMPORTANCE ET FREQUANCE.....	4
V - EPIDEMIOLOGIE DE LA BRUCELLOSE BOVINE	6
V-1- Réservoir de <i>Brucella abortus</i> et foyers brucelliques	6
V-2- Espèces animales infectées.....	7
V-3- L'agent étiologique.....	7
V-3- 1- Nomenclature et taxonomie	7
V-3- 2- Habitat.....	8
V-3- 3- Morphologie et structure	9
V-3- 4- Caractères cultureux	9
V-3-4-1-Conditions physico-chimiques	9
V-3-4-2- Milieux de culture	11
V-3-5- Caractères biochimiques	11
V-3-5-1- Métabolisme glucidique	12
V-3-5-2- Métabolisme protéique	12
V-3-5-3- Aliments	12
V-3-6- Caractères antigéniques	12
V-3-6-1- Les antigènes.....	12
V-3-6-1-1- La bactérie Smooth (S ou lisse)	13
V-3-6-1-2- Bactéries Rough (R ou rugueuses)	14
V-3-7- Pouvoir pathogène naturel.....	15
V-3-7-1- Chez l'animal.....	15
V-3-7-2- Chez L'homme	18
V-3-8- Pouvoir pathogène expérimental	18
V-3-9- Pouvoir immunogène	18
V-3-10- Sensibilité et résistance	19
V-4- Transmission de l'infection	19
V-4-1-Transmission horizontale.....	19

V-4-2- <i>Transmission verticale</i>	20
V-5- Evolution de la maladie	20
V-6- Pathogénie	20
V-7- Symptômes et lésions.....	21
V-8- Réponse de l'organisme à l'infection.....	22
V-8-1- <i>Réponse humorale</i>	22
V-8-2- <i>Réponse cellulaire</i>	22
V-9- Diagnostic	23
V-9-1- <i>Diagnostic clinique</i>	23
V-9-2- <i>Diagnostic de laboratoire</i>	23
V-9-3- <i>Diagnostic biologique</i>	24
V-9-4- <i>Diagnostic différentiel</i>	25
V-10- Traitement	25
V-11- Prophylaxie	25

CHAPITRE (II) :

LES RETENTIONS PLACENTAIRES ET LES AVORTEMENTS

1- GENERALITES	28
1-1- Les annexes fœtales	28
1-2- La placentation.....	29
1-2-2- <i>Rôles du placenta</i>	29
1-2-3- <i>Mécanisme de placentation chez la vache</i>	30
1-3- La délivrance.....	32
1-3-1- <i>Définition</i>	32
1-3-2- <i>Mécanisme de délivrance</i>	32
II- LES RETENTIONS PLACENTAIRES	33
II-1- Définition et synonymies	33
II-2- Fréquence et importance	33
II-3- Etiologie	35
II-4- Pathogénie	36
II-5- Traitement	36
III- LES AVORTEMENTS.....	38
III-1- Définition	38
III-2- L'avortement brucellique chez les bovins	38
III-3- Mécanisme de l'avortement brucellique.....	38

CHAPITRE (III) :
METHODES DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA
BRUCELLOSE

I- GENERALITES	43
II- METHODES SEROLOGIQUES DE DIAGNOSTIC	44
II-1- Epreuves à l'antigène tamponné de <i>Brucella</i> (BPATs)	44
II-2- Test de fixation de complément (FC)	45
II-3- Méthodes immuno-enzymatiques	45
II-4- Test de polarisation de fluorescence (FPA : fluorescence polarization assay)	45
II-5- Epreuve de séro-agglutination lente en tube ou séro-agglutination de Wright(SAW)	46
II-6- Epreuves de l'Haptène natif ou au poly B.....	46
II-7- Test réalisé sur le lait (<i>Test de l'anneau ou Ring test (RT)</i>).....	47
III- LES REACTIONS SEROLOGIQUES CROISEES	49

PARTIE EXPERIMENTALE

I- PROBLEMATIQUE ET OBJECTIF.....	50
II- MATERIELS ET METHODES.....	51
III- RESULTATS.....	55
IV- DISCUSSION.....	60
CONCLUSION GENERALE.....	63
ANNEXES	
REFERENCES BIBLIGRAPHIQUES	

Introduction :

La brucellose existe en Algérie depuis le 19^{ème} siècle et ce n'est qu'en 1995 que sont initiés des programmes de lutte visant son éradication [74]. Durant cette période, l'évolution de cette pathologie a connu des hauts et des bas, d'une année à une autre, mais sans aucune réelle amélioration.

Elle cause des pertes économiques très lourdes du fait de la très faible indemnisation, qui n'est actuellement que de 35% de la valeur réelle de l'animal, la chute de la production laitière, les avortements et le coût des interventions du vétérinaire qui s'imposent lors d'une RP.

Les avortements représentent le signe cardinal dans 80% des cas de la brucellose aigüe et les RP caractérisent la brucellose chronique chez les bovins

Qualifiée de zoonose majeure et maladie professionnelle, elle touche l'homme à l'occasion d'une simple consommation de produits laitiers crus contaminés ou lors d'une intervention sur un animal infecté. On dénombre 3524 cas humains déclarés uniquement pour l'année 2004 en Algérie [73]. Elle se manifeste, chez l'homme, par une fièvre sudoro-algique ondulante très sévère, avec parfois des séquelles irréversibles, à savoir la stérilité chez l'homme.

La Daïra de M'chedalah (Bouira) comprend un effectif total de vaches de 802 dont seulement 200 sont dépistées (24,93%) , à la Daïra de Tazmalt (Béjaïa), 264 sujets sont dépistés sur un total de vaches de 858, un taux de dépistage correspondant à 30,76%, pour l'année 2007.

Nous avons remarqué, lors de sorties avec un vétérinaire praticien, une fréquence élevée des avortements et des RP dans ces deux régions. La fréquence élevée de ces deux symptômes de suspicion nous a incité à faire une étude sur les interrelations entre les symptômes de la brucellose et la sérologie.

CHAPITRE I :

**GÉNÉRALITÉS SUR LA
BRUCELLOSE.**

I- DEFINITION :

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et à l'homme, due à des bactéries du genre *BRUCELLA*.

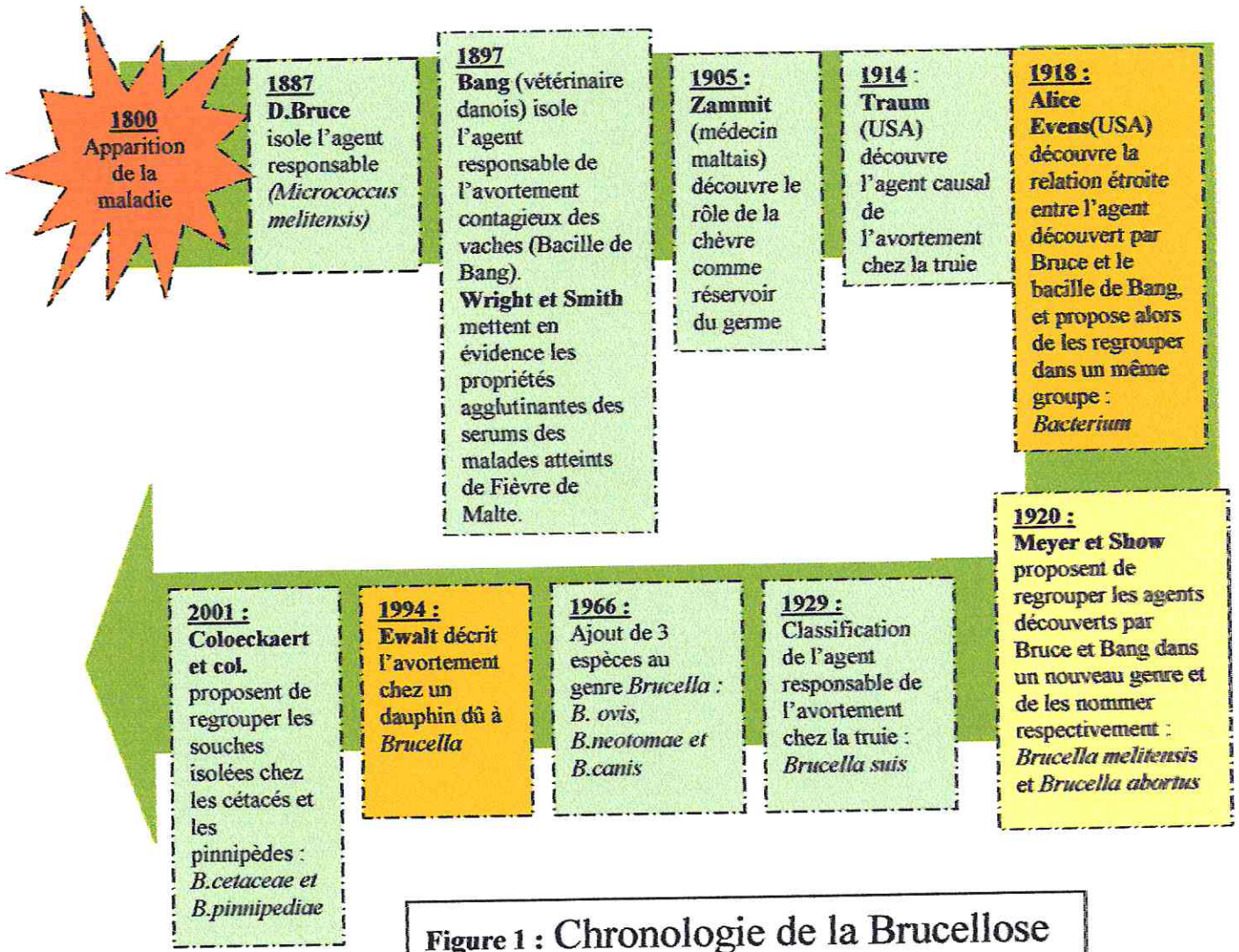
Elle se définit chez l'animal comme une maladie d'évolution chronique affectant principalement les organes de la reproduction et dont la manifestation clinique la plus fréquente est l'avortement et/ou rétention placentaire [17].

II- HISTORIQUE :

La brucellose a été décrite pour la première fois en 1861, sur l'île de Malte, par un médecin anglais nommé Marston [71]. C'est D. BRUCE, médecin capitaine britannique qui a isolé en 1887 la bactérie responsable de la fièvre Méditerranéenne encore appelée fièvre de Malte, fièvre ondulante ou Mélitococcie [4].

En effet, c'est lors des guerres napoléoniennes que les Britanniques débarquèrent en 1800 sur l'île de Malte afin d'en chasser les Français. Depuis cette date, et durant tout le XIXe siècle et le début du XXe siècle, cette maladie fit de sévères ravages parmi les soldats et les marins de la cargaison maltaise. Cette situation explique les nombreuses recherches conduites par le corps médical de l'armée britannique, mais aussi par les médecins locaux [3].

La chronologie de la brucellose se résume dans la figure 1.



III- REPARTITION GEOGRAPHIQUE :

Très peu de pays échappent à la maladie et ceux qui paraissent indemnes sont en réalité le plus souvent ceux où la maladie n'a pas été recherchée, exception faite pour les rares pays où une éradication stricte et bien conduite a éliminé la brucellose [1] comme par exemple : le Canada, l'Allemagne, la Suisse et le Danemark [18].

La répartition des principales espèces de *Brucella* et leurs biotypes n'est pas strictement liée à des aires géographiques bien définies. Dans la plupart des régions du monde, les trois principales espèces de *Brucella* sont retrouvées, toutefois, quelques traits dominants peuvent être dégagés. C'est ainsi que *B. abortus* domine nettement en Afrique. En Europe, c'est également *B. abortus* qui domine [1].

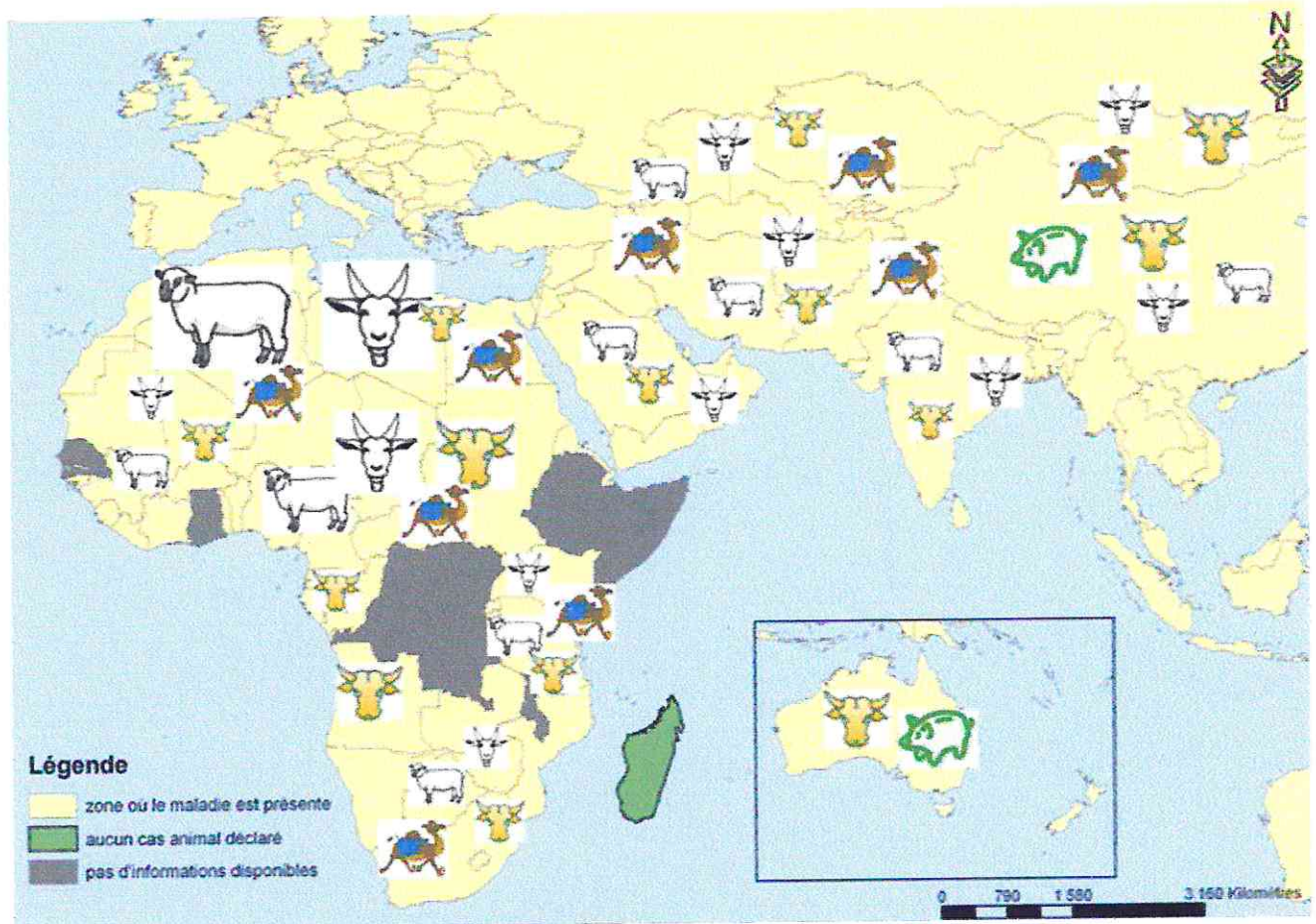


Figure 2 : Statut des pays et principaux réservoirs de brucellose par zone géographique en Asie, en Océanie et en Afrique (d'après Memish [77])
 Note : si l'Australie connaît des foyers de brucellose, le Japon, la Nouvelle Zélande et la Nouvelle Calédonie sont en revanche indemnes de toute brucellose animale

IV- IMPORTANCE ET FREQUENCE :

Sur le plan hygiénique, la brucellose bovine est considérée par la fréquence et la gravité des cas humains contractés à partir des bovins et leurs productions une ZOONOSE MAJEURE quoique l'homme n'est qu'un hôte accidentel pour les brucelles.

La large répartition géographique fait de la brucellose un problème mondial [17] (figure 3). De nombreuses espèces animales peuvent être infectées par les différentes espèces de *Brucella* [9]. Dans les élevages infectés, la fréquence peut atteindre 100% [14].

La brucellose bovine est encore très répandue à l'échelle du monde, elle est même en développement sur certains continents (Afrique par exemple) [18] (figure2). Les pertes dues à *Brucella abortus* peuvent se résumer en :

- Baisse de lactation des vaches ayant avorté.
- La stérilité qui fait habituellement suite à l'avortement.

- Augmentation de la durée de la période entre les lactations et perturbations du plan de la reproduction, et cela est d'importance surtout dans les cheptels destinés à la viande.
- La stérilité permanente ou temporaire entraîne l'élimination de nombreuses vaches.
- Quelques cas de mortalité se produisent à la suite de métrites aiguës dues à la rétention placentaire.

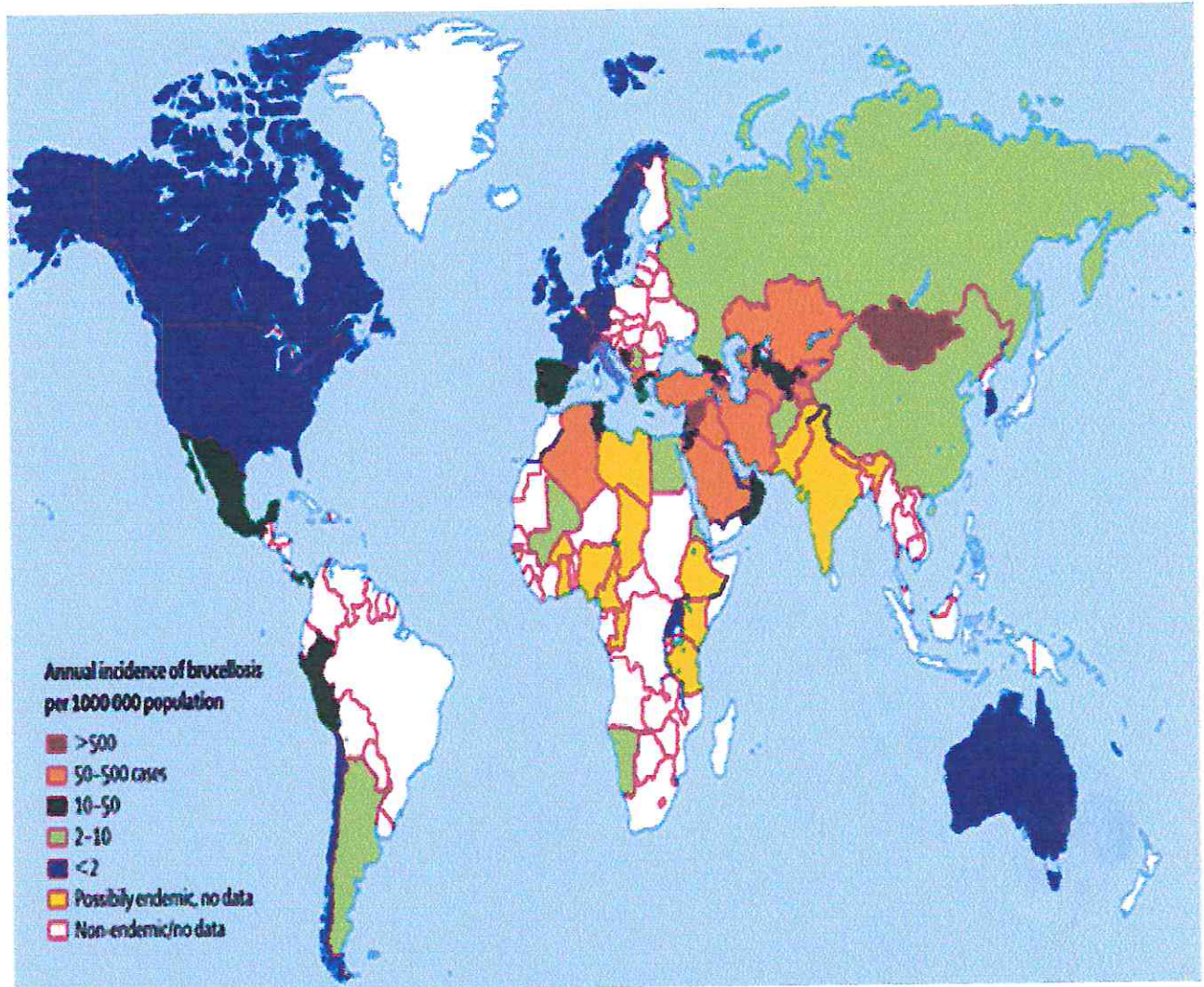


Figure 3 : Incidence annuelle de la brucellose par 1000 000 population (2006) [75].

La brucellose bovine entraîne de très graves pertes pour l'élevage, en raison de son impact économique sur la santé et les productions bovines, ainsi que les séquelles de la maladie chez l'homme, des moyens ont donc été dégagés dans de nombreux pays industrialisés afin de mener à bien des programmes de contrôle, puis d'éradication de la brucellose bovine. Une étude canadienne a montré que chaque dollar investi dans un programme de lutte permettait à l'éleveur d'éviter cinq dollars de perte liés à l'infection de son cheptel [3].

En Algérie, la brucellose bovine n'a jamais cessé d'exister, néanmoins, son évolution durant ces dernières années a connu quelques oscillations qui sont dans l'ensemble défavorables.

Les tableaux suivants nous illustrent ces dires et nous montrent à la fois, le nombre des cas positifs, le taux d'atteinte et le nombre des animaux positifs abattus, et chaque statistique nous révèle nettement un fin pourcentage qui échappe à l'abattage pour constituer le facteur principal de l'aspect endémique de la brucellose bovine en Algérie.

Tableau.1. et .II. Statistiques sur la brucellose bovine en Algérie 2000-2006 (MADR, 2006).

Année	Effectif dépisté	Animaux positifs	Taux d'atteinte (%)
2000	87610	588	0.67
2001	104183	886	0.85
2002	91079	758	0.83
2003	89294	796	0.89
2004	114481	756	0.66
2005	144313	1046	0.72
2006	14550	1206	0.82

Tableau .II.

Année	Animaux positifs	Nombre d'animaux abattus	Pourcentage des animaux abattus (%)
2000	588	472	80.27
2001	886	545	92.69
2002	758	775	87.47
2003	796	590	77.84
2004	756	560	90.35
2005	1046	637	84.26
2006	1206	867	82.89

V- EPIDEMIOLOGIE DE LA BRUCELLOSE BOVINE :

V-1- Réservoir de *Brucella abortus* et foyers brucelliques :

Il est très difficile d'apprécier l'importance épidémiologique éventuelle d'un réservoir de *Brucella abortus* au sein de la faune sauvage [3]. Le réservoir du germe est constitué par les animaux d'élevage, classiquement les bovins pour *Brucella abortus* [4] et des animaux infectés, malades ou apparemment sains, transitoirement par le milieu extérieur contaminé [17].

Les bovins ne sont que des hôtes de prédilection car la spécificité d'espèce n'est pas rigoureuse [10] (tableau III). Les animaux malades excrètent des brucelles par les urines, le lait, le placenta et les lochies lors de la mise bas, et par les produits des avortements, ces derniers représentent la principale matière virulente.

Conséquence : dissémination importante des *Brucella* et contamination des autres animaux et des humains.

Quand aux foyers brucelliques, ils sont situés dans les exploitations agricoles où se trouvent des bovins, des ovins et des caprins ou des porcs [4].

V-2- Espèces animales infectées :

Brucella abortus infecte essentiellement les bovins domestiques, mais la bactérie peut atteindre d'autres espèces domestiques, telle que le buffle d'Asie, le yack ou le dromadaire ainsi que plusieurs ruminants sauvages [3]. Dans certains pays, particulièrement en Europe méridionale et en Asie occidentale, où les bovins sont en contact étroit avec des ovins et caprins, la brucellose bovine peut également être causée par *Brucella melitensis*. *Brucella suis* peut induire une infection mammaire chez les bovins, mais il n'a pas été rapporté l'avortement ou la rétention placentaire [25].

L'homme est sensible à toutes les espèces de *Brucella*, ce qui constitue un problème de santé publique [3]. La brucellose humaine est souvent une maladie professionnelle [9].

- *Sensibilité individuelle* : il ne semble pas exister de races bovines plus résistantes que d'autres à l'infection brucellique et aucune étude en conditions contrôlées n'a montré que les mâles soient plus résistants que les femelles [3].

V-3- L'agent étiologique :

V-3-1- Nomenclature et taxonomie :

Le genre *Brucella*, autrefois classé dans la famille des *parvobacteriaceae* est constitué de bâtonnets de petites tailles, ne gardant pas la coloration de Gram, et dont le pouvoir glucidolytique est faible. Le genre est défini en relation avec la composition de l'ADN, les caractéristiques morphologiques, culturelles et biochimiques [1].

Le genre *Brucella* appartient à la famille des *Brucellaceae* et il est constitué de 6 espèces : *Brucella abortus* constituée de 7 biovars (1,2,3,4,5,6,9), *Brucella melitensis* constituée de 3 biovars(1,2,3), *Brucella suis* avec 5 biovars (1,2,3,4,5) et puis *Brucella ovis*, *Brucella canis* et *Brucella neotomae* [2].

En 1994, EWALT décrit pour la première fois un avortement chez un dauphin maintenu en captivité et dû à une bactérie appartenant au genre *Brucella*, mais ne pouvant pas être identifiée à

l'une des six espèces de *Brucella* déjà connues. L'isolement de *Brucella sp* chez des cétacés et des pinnipèdes a été depuis rapporté à plusieurs reprises. En 2001, CLOECKAERT *et al*, proposent de grouper ces souches de *Brucella* en deux nouvelles espèces: *Brucella cetaceae* et *Brucella pinnipediae* [3].

V-3-2-Habitat :

Les Brucelles sont des bactéries pathogènes strictes. Elles ne sont pas retrouvées chez l'animal sain [2]. L'homme n'est qu'un hôte accidentel pour les *Brucella* qui sont avant tout les agents d'une zoonose pouvant atteindre à peu près tous les animaux domestiques et sauvages. Les animaux domestiques sont les plus atteints et il est classique de considérer que *Brucella melitensis* sévit chez les caprins et les ovins, *Brucella abortus* chez les bovins et *Brucella suis* chez les porcins. Si ces notions sont exactes pour l'essentiel, elles n'ont rien d'absolu et il n'est pas exceptionnel de rencontrer des bovins infectés par *Brucella melitensis* et des ovins contaminés par *Brucella abortus* [1] comme le montre le tableau (III).

Tableau. III: La diversité d'hôtes pour les différentes espèces de *Brucella*.

Espèces bactériennes	Espèces animales sensibles	Espèces animales réceptives	
<i>B. melitensis</i>	caprins, ovins	bovins, chiens, homme, animaux sauvages, rarement les porcins	Ces espèces animales constituent le réservoir de <i>Brucella</i> pour l'homme
<i>B. abortus</i>	bovins	Camelins, animaux sauvages, homme, caprins, ovins et porcins	
<i>B. suis</i>	porc	Lièvre, homme, rarement bovins, ovins, caprins.	
<i>B. canis</i>	chiens		
<i>B. ovis</i>	ovins		
<i>B. neotomae</i>	Isolée chez un rat du désert		

V-3-3-Morphologie et structure:

Toutes les brucelles ont en commun le fait d'être des petits coccobacilles ou de petits bâtonnets, mesurant de 0.6µm sur 0.5 - 0.8 µm [3]. Elles sont généralement isolées, quelque fois disposées en paires ou en petits amas, plus rarement en courtes chainettes, Gram négatif, immobiles, acapsulées, asporulées [2] (figure 5).

Bactéries à multiplication intracellulaire facultative [4]. Elles ne sont pas colorées par l'acide acétique (coloration de Stamp) ce qui indique une acido-résistance relative liée aux lipides de la paroi (figure 4). On a décrit ni flagelle ni pili [1].

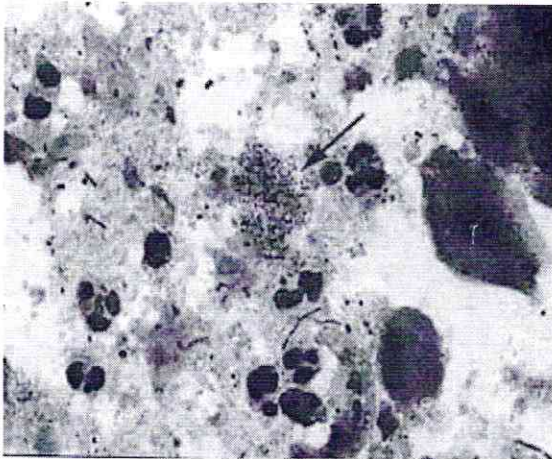


Figure 4 : Bactérioscopie par coloration de Stamp. Les Brucelles apparaissent comme des coccobacilles colorés en rouge- fuchsia (flèche) [19].

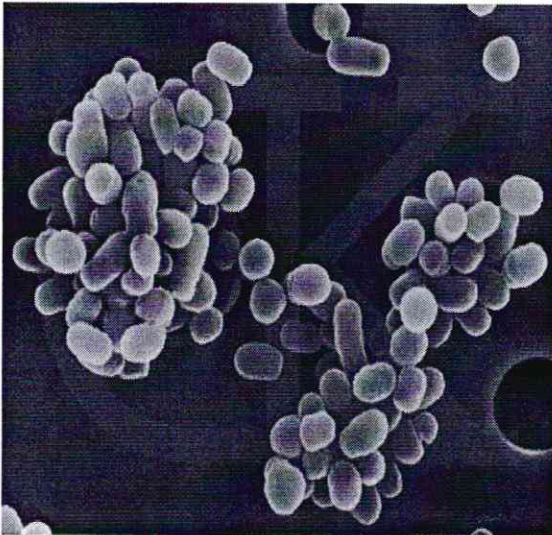


Figure 5 : *Brucella abortus* au microscope électronique [10].

V-3-4- Caractères cultureux :

V-3-4-1-Conditions physico-chimiques :

Le pH exigé pour la croissance des brucelles varie entre 6.6 - 7.4. La température de culture peut varier entre 20 - 37°C. La température optimale de croissance étant 34°C, bien que les brucelles soient habituellement cultivées en 37°C [1].

Les brucelles sont aérobies strictes, et l'aération des cultures par agitation ou par apport direct d'oxygène augmente leur taux de croissance, de nombreuses souches de *B.abortus* exigent, à l'isolement, une teneur en gaz carbonique de 5 - 10 % [1].

Il faut toujours plus de 48H et même parfois plusieurs semaines pour obtenir des colonies à partir d'un produit pathologique [4]. Leurs croissance est lente mais elle peut être accélérée sur certains milieux riches comme des géloses additionnées de sérum ou de glucose [3].

En milieu liquide, la culture apparaît en 48 heures à 4 jours et donne un trouble homogène [1]. Les incubations de 7 jours, les souches lisses produisent un trouble modéré et homogène avec apparition dans certains cas d'un voile très fragile et d'un dépôt poudreux clair, les souches rugueuses peuvent produire un dépôt granuleux, la formation du trouble et du dépôt est variable.

Sur boîte de Pétri, les colonies sont, pour les formes S (Smooth), rondes, translucides, lisses et convexes et de contours nets (figure 6). Cet aspect des colonies est dû à la présence d'un lipopolysaccharide (LPS) dans la membrane externe de la bactérie. A l'examen des boîtes à la lumière réfléchi oblique, les colonies lisses sont généralement rondes brillantes et d'une couleur allant du bleu au bleu-vert [2]. Parfois, les colonies rugueuses et opaques apparaissent (forme Routh), suite à des mutations spontanées. Quant aux espèces naturellement rugueuses (*B. ovis*, *B. canis*) elles ne donnent jamais de colonies de type lisse. Les colonies rugueuses sont légèrement plus grandes, ont un aspect sec, granuleux et une couleur allant du jaune au blanc jaunâtres [2].

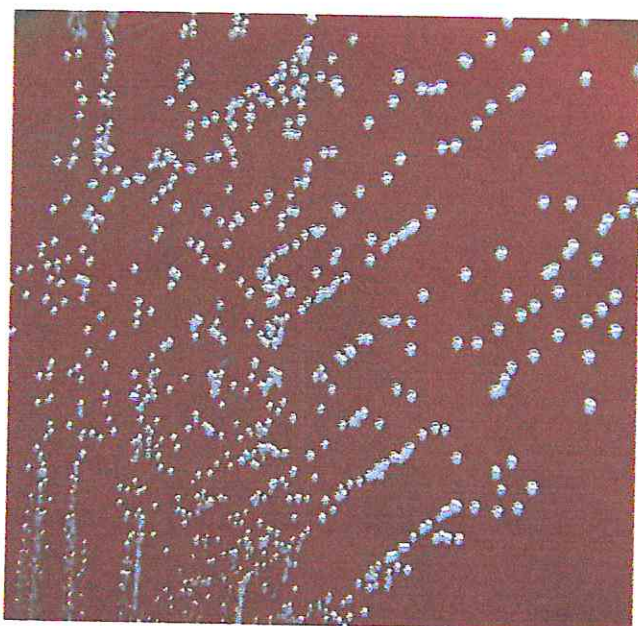


Figure 6 : Colonies de *B. melitensis* (Type S) [10].

V-3-4-2- Milieux de culture :

L'isolement de *Brucella* à partir de produits pathologiques nécessite des milieux spéciaux, mais en général, après quelques repiquages, les souches conservées au laboratoire poussent sur les milieux usuels.

De nombreux milieux ont été utilisés depuis que BRUCE, en 1887, a utilisé un bouillon de viande et stafseth ; en 1920, un milieu à base d'infusion de pomme de terre additionné de glycérine. Il est recommandé lorsqu'on veut essayer la valeur d'un milieu, d'utiliser *Brucella abortus* biotype 2 qui est le plus exigeant.

➤ Milieux liquides :

Les bouillons à l'extrait de viande, additionnés d'extraits de levures, de glycérine ou de sérum de bovin ou de cheval donnent satisfaction. Les milieux commerciaux les plus utilisés sont trypticase soy, le bouillon tryptosé et le bouillon albimi.

➤ Milieux solides :

La gélose glucosée au sérum, la gélose glucosée au glycérol, la gélose à l'infusion de pomme de terre, la gélose additionnée de 5% de sang de mouton sont les milieux les plus habituels. Parmi les milieux commercialisés, on peut citer la gélose trypticase soy, la gélose tryptosée et la gélose albimi.

➤ Milieux sélectifs :

L'isolement de *Brucella* à partir de prélèvements contaminés par d'autres bactéries ou par des champignons nécessite l'emploi de milieux sélectifs, préparés à partir des milieux de base mentionnés ci-dessus auxquels on ajoute des antibiotiques et des antifongiques. Un des plus utilisés est celui de Kuzdas et Morse comprenant de cycloheximide, de la bacitracine et de la polymixine [1].

V-3-5- Caractères biochimiques :

Aérobies strictes, certaines souches de *B.abortus* exigent une atmosphère de 5-10% de CO₂ pour leur isolement à partir de l'organisme humain ou animal [1]. Les brucelles ont un métabolisme plutôt oxydatif que fermentatif (Tableau IV).

- Elles sont catalase positives ;
- Oxydase généralement positives, excepté *B.neotomae*, *B.ovis* et certaines souches de *Brucella abortus* qui sont oxydase négatives [2].

V-3-5-1- Métabolisme glucidique :

Elles ne fermentent pas ou ne provoquent qu'une faible fermentation des glucides dans les milieux usuels [2]. L'utilisation des sucres est assez lente. Les sucres généralement étudiés pour différencier les espèces sont le L-arabinose, D-galactose, D-ribose et D-xylose. Les brucelles n'utilisent pas le citrate [1].

V-3-5-2- Métabolisme protéique :

Le métabolisme oxydatif des acides aminés est étudié [1]. Les brucelles oxydent divers acides aminés [2]. Les substances habituelles utilisées sont : L-alanine, D-alanine, L-asparagine, acide L-glutamique, D-L-citrulline, L-lysine, L-arginine et D-L-ornithine. A partir des acides aminés soufrés, la production d'hydrogène sulfuré (H₂S) est variable suivant les milieux et les espèces. *B.melitensis* ne dégage pas, ou très peu, d'hydrogène sulfuré, tandis que *B.abortus* en dégage pendant 2 jours, et certains biotypes de *B.suis* pendant 4-5 jours. Toutes les espèces de *Brucella*, sauf *B.ovis* ont une activité uréasique plus au moins rapide. Les brucelles ne produisent pas d'indole (tableau IV).

V-3-5-3- Aliments :**➤ Source d'azote :**

L'ion ammonium constitue une source d'azote suffisante pour certaines souches, mais la multiplication est moins bonne que si on leur fournit des acides aminés. Bien que les brucelles réduisent les nitrites en nitrates, les nitrites ne sont pas utilisés comme source d'azote [1].

➤ Source de carbone et aliments énergétiques :

Le glucose est le sucre habituellement utilisé, mais il peut être remplacé par le galactose ou le fructose ainsi que par l'acide lactique [1].

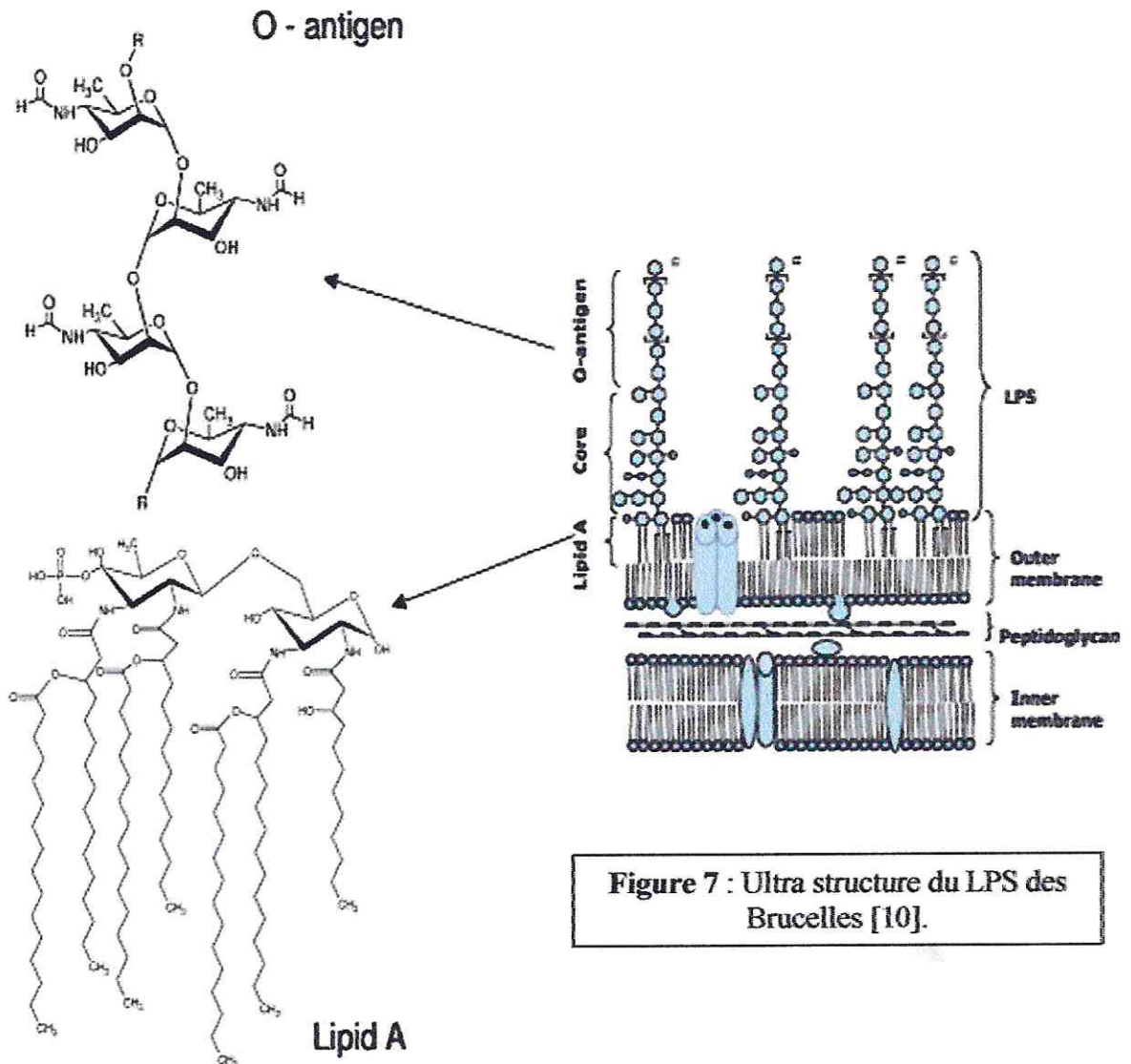
➤ Facteurs de croissance :

- les ions de Na peuvent être remplacés par les ions K.
- le soufre peut être emporté sous forme organique ou minérale.
- le Mg et Fe sont indispensables
- le thiamine, la niacine et biotine sont des vitamines indispensables, tandis que de nombreuses souches de *B.abortus* et *B. melitensis* ou *B.suis* exigent en outre de Pantothénate de Calcium et de l'acide nicotinique [1].

V-3-6- Caractères antigéniques :**V-3-6-1- Les antigènes :**

Parmi les principaux antigènes figurent les complexes lipopolysaccharides (LPS) lisses et rugueux (LPS-S, LPS-R) (figure 7) et les deux polysaccharides apparentés,

l'haptène natif HN et le polysaccharide B (polyB) et au moins 20 antigènes protéiques ou glucoprotéiques [2]



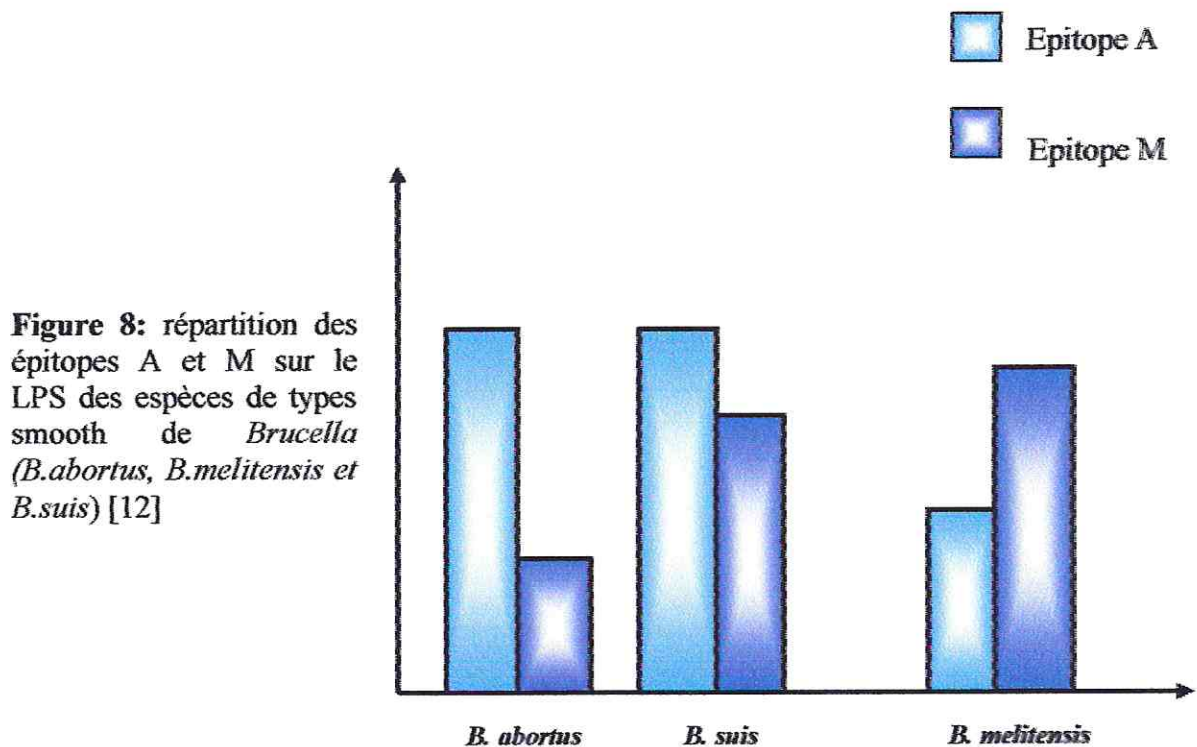
V-3-6-1-1- La bactérie Smooth (S ou lisse) :

➤ Antigène de surface :

• LPS (lipopolysaccharide) :

Le LPS est la structure antigénique majeure de la surface des *Brucella*. Il est identifié aux antigènes A et M (AgA et AgM) démontrés par des méthodes sérologiques chez toutes les *Brucella* en phase S appartenant aux espèces *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*. Leur répartition quantitative varie selon les espèces : l'AgA prédomine dans certains biotypes de *B.abortus*, l'AgM prédomine dans

B.melitensis. L'AgA et l'AgM sont en quantité intermédiaire dans *B.suis* [1]. (figure8).



- **Polysaccharide B (poly B) :**

Le polysaccharide B, bien qu'associé à la paroi n'intervient pas dans l'agglutination des bactéries, mais précipite dans un milieu gélifié contenant l'antisérum. Il est identique dans toutes les espèces de *Brucella*, S ou R, il est reconnu par les sérums d'animaux infectés, mais non par les sérums d'animaux vaccinés [1].

- **Antigène commun avec d'autres bactéries :**

Il existe des Ag communs à *Brucella* et à d'autres bactéries (*Yarsinia enterocolitica* O9, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*). La réaction croisée entre *Brucella* et *Yarsinia* est due au LPS-S, dont certains déterminants sont communs à *Brucella* et à *Yarsinia* [1].

V-3-6-1-2- Bactéries Rough (R ou rugeuses) :

Les mutants obtenus à partir des *Brucella* S perdent le LPS-S, qui est remplacé par un LPS-R commun à toutes les espèces de *Brucella* sous forme R (*B ovis*, *B canis*, *B neotomea*), elles n'ont pas l'Ag A et M mais possèdent l'Ag R [1].

Des chercheurs ont identifié un facteur de virulence des bactéries rarement pris en compte dans la lutte contre ces microorganismes pathogènes : la lumière. La bactérie *Brucella abortus*, augmente sa virulence lorsqu'elle est exposée à la lumière bleue, grâce à des photorécepteurs sensibles à ce spectre lumineux, expliquent aujourd'hui des chercheurs dans la revue *Science*. Privée de lumière, la bactérie *B. abortus* perd 90% de sa virulence, notent les chercheurs, qui ont obtenu le même résultat en désactivant un gène chez la bactérie. Ce gène code pour des photorécepteurs de la lumière bleue appelés domaines LOV parce qu'ils sont sensible à la lumière, à l'oxygène et à la tension électrique ou voltage. Les domaines LOV ont été découverts il y a une dizaine d'années chez les plantes et sont également présents chez certaines bactéries. Cependant, chez ces dernières, leur fonction n'était pas très claire. Swartz et ses collègues démontrent désormais que la lumière bleue permet à la bactérie *Brucella abortus* de stimuler l'activité d'une enzyme, la kinase, qui contribue à augmenter la virulence de la bactérie, autrement dit sa capacité [70].

V-3-7- POUVOIR PATHOGENE NATUREL :

V-3-7-1- Chez l'animal :

➤ Bovins :

La maladie due le plus souvent à *B.abortus*, peut rester latente sans manifestations cliniques pendant longtemps. Les Brucelles se multiplient très rapidement dans le placenta entraînant l'avortement entre le 5ème et le 9ème mois. On constate des foyers de nécrose au niveau du chorion tandis que le fœtus mort est infecté par de très nombreuses Brucelles dans tous ses organes.

Les lésions utérines peuvent entraîner une stérilité ultérieure chez la vache. Si la vache reste féconde, et bien que l'infection n'a pas une tendance spontanée à la guérison, une immunité se développe permettant aux gestations ultérieures d'arriver à terme [1].

Dans un élevage de bovins infecté, le nombre d'avortements est très important au début, et peut intéresser, la 1ère année, de 40-80% des vaches. C'est du point de vue épidémiologique, la phase aigue de la maladie. Mais dès la 2ème année, la maladie passe dans une phase chronique et les avortements deviennent rares, affectant essentiellement les génisses et les vaches récemment introduites [9].

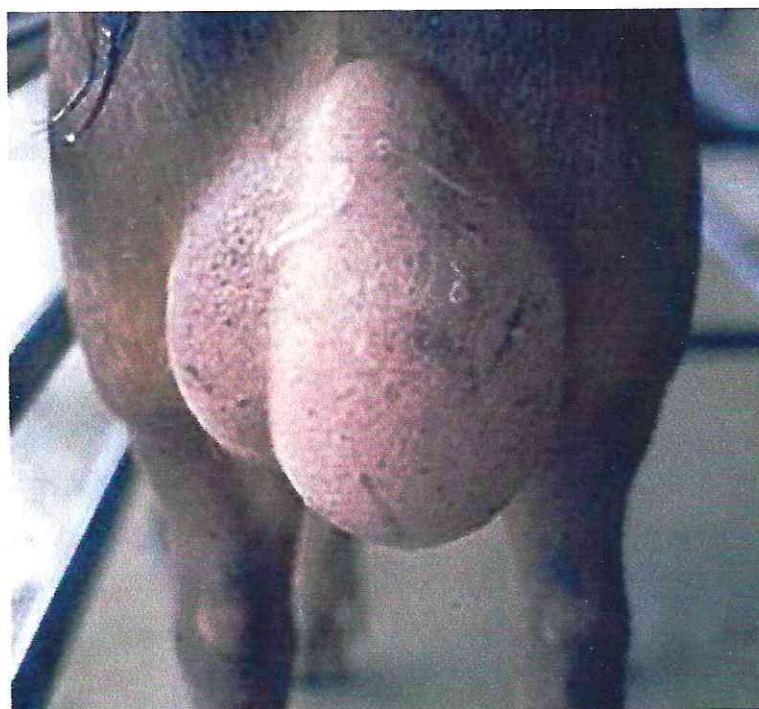
Chez le taureau, tous les organes de l'appareil génital peuvent être atteints avec prédominance des lésions des testicules [10]. (Figure 10).

L'infection brucellique des vaches ne se manifeste pas nécessairement par l'avortement et une vache infectée pouvait excréter des Brucelles par le colostrum et le lait en l'absence de signes cliniques [1].



Figure 9: Lésion suppurative de type hygroma due aux brucelles. (Western College of Veterinary Medicine)

Fig 10 : Orchite due aux brucelles
(Western College of Veterinary
Medicine)



France, et dont 17% lors d'un séjour à l'étranger dans un pays méditerranéen [4]. Il n'existe pas de contamination interhumaine [4].

V-4-2- Transmission verticale :

La brucellose peut également être transmise de la mère à son veau, in utero ou immédiatement après sa naissance [3]. Le jeune né d'une femelle brucellique représente, même après avoir été isolé dès la naissance, un danger lorsqu'il est utilisé pour le repeuplement [17].

V-5- Evolution de la maladie :

La brucellose bovine est une **infection chronique** [3]. La maladie due le plus souvent à *Brucella abortus* peut rester latente, sans manifestations cliniques pendant longtemps [1].

Bien qu'une vache malade n'avorte en général qu'une fois, elle reste infectée et peut excréter des bactéries dans le lait et les sécrétions du tractus génital au cours d'un vêlage ultérieur apparemment normal [3]. Si la vache reste féconde après le premier avortement, et bien que l'infection n'ait pas une tendance spontanée à la guérison, une immunité se développe permettant aux gestations ultérieures d'arriver à terme [71].

V-6- Pathogénie :

Comme dans toute maladie infectieuse, l'initiation de l'infection dépend de facteurs liés à la bactérie (dose, virulence), à l'hôte (résistance naturelle, âge, sexe, état physiologique) et l'environnement [3].

Les brucelles pénètrent généralement dans l'organisme au niveau de la muqueuse orale, du nasopharynx, des conjonctives et par voie génitale, mais également par les abrasions ou des lésions cutanées [49]. Le franchissement de cette première barrière de protection de l'hôte provoque une réaction inflammatoire aigue dans la sous muqueuse, avec infiltration de leucocytes polynucléaires neutrophiles et de monocytes [3].

Les brucelles ayant pénétré dans l'organisme, gagnent par voie lymphatique le premier relais ganglionnaire. Elles se multiplient, et de là, elles essaient ailleurs par voie lymphatique et sanguine [1] très certainement sous forme intracellulaire [3] c'est-à-dire, elles sont phagocytées par les cellules du ganglion ; dans certaines cellules, elles sont dégradées et libèrent leurs antigènes et leurs endotoxines, dans d'autres cellules, elles se multiplient et provoquent des lésions. La réaction de l'organisme aux antigènes libérés est avant tout une réponse immunitaire thymo-dépendante, avec hypersensibilité retardée [1].

Brucella est, le plus fréquent, isolée des tissus lymphoïdes, de la glande mammaire et des organes reproducteurs, mais d'autres localisations sont possibles (os, articulations, tissu nerveux, yeux) [50]. L'*erythritol*, qui est produit dans l'utérus des bovins gestants, stimule la croissance de *B.abortus*. La grande concentration d'*erythritol* dans le placenta et les eaux fœtales pourrait expliquer la localisation de l'infection dans ces tissus [16,53]. La multiplication des brucelles dans le placenta est très rapide, entraînant l'avortement entre le 5^{ème} et le 9^{ème} mois de gestation [1] associé ou non à la rétention placentaire due à des adhérences consécutives à la réaction inflammatoire locale.

➤ **Situation intracellulaire des brucelles :**

L'établissement de l'infection chronique par *Brucella* résulterait de sa capacité à survivre dans les cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages), qui la mettent à l'abri des mécanismes extracellulaires de défenses de l'hôte tel que le complément et les anticorps [59, 57]. Une relation existe entre la virulence d'une souche et sa capacité à se multiplier dans les cellules phagocytaires [3], l'activité antimicrobienne des macrophages est modulée par la production séquentielle de cytokines [3] le TNF α (Tumor Necrosis Factor Alpha) est l'une des premières cytokines sécrétée par le macrophage, et sa production résulte de l'interaction entre la bactérie et le macrophage. La capacité des macrophages à produire le TNF α est une étape critique de leur activation [52]. Un composé sécrété par *Brucella* inhibe spécifiquement la synthèse du TNF α . Cet inhibiteur constitue donc un facteur de virulence intervenant dans un mécanisme de résistance précoce de *Brucella* à l'effet bactéricide de l'hôte, favorisant ainsi son développement dans ces cellules [71].

V-7- Symptômes et lésions :

Le symptôme cardinal de la brucellose est *l'avortement*. Celui-ci intervient généralement entre le 5^{ème} et le 9^{ème} mois de gestation [3]. Même en l'absence d'avortement, une importante quantité de bactéries est excrétée par le placenta, les sécrétions vaginales et fœtales. La glande mammaire et les nœuds lymphatiques associés peuvent aussi être infectés et les *Brucella* peuvent être excrétées par le lait [22]. On constate des foyers de nécrose au niveau du chorion, tandis que le fœtus mort est infecté par de très nombreuses *Brucella* dans tous ses organes. Les lésions utérines peuvent entraîner une stérilité ultérieure des vaches [1]. Dans un élevage de bovins infectés, le nombre d'avortements est très important au début et peut intéresser la première année, de 40 – 80% des vaches. C'est du point de vue épidémiologique la phase aiguë de la maladie [32]. Mais la deuxième année, la maladie passe dans une phase chronique, et les avortements deviennent rares [32] laissant place à des rétentions placentaires, quasiment à chaque mise- bas.

Sur le plan anatomopathologique, on observe un œdème inflammatoire qui affecte l'union entre les caroncules et les cotylédons [33]. Les altérations cicatricielles provoquées par la placentite sont à l'origine des adhérences entre les villosités choriales et les parois des cryptes utérines, ce qui favorise donc la rétention placentaire [6].

Chez le taureau, tous les organes de l'appareil reproducteur peuvent être atteints, avec prédominance des lésions du testicule [1] (figure 9). On peut rencontrer des hygromas, localisés principalement au niveau de l'articulation du carpe, renfermant un produit de suppuration très riche en brucelles (figure 8).

V-8- Réponse de l'organisme à l'infection :

V-8-1- Réponse humorale :

Elle est définie par une apparition d'anticorps post infectieux, décelables grâce à diverses réactions sérologiques et présents dans diverses sécrétions (lait, mucus vaginal, sperme). Les anticorps mis en évidence par les réactions sérologiques habituellement, n'interviennent pas dans l'immunité, ils sont simplement des témoins d'une infection (ou d'une vaccination) [17].

Cette réponse est principalement dirigée contre l'antigène majeur de *Brucella*, à savoir son LPS et plus particulièrement sa chaîne O [3] (figure 6).

La réponse est constituée par l'élaboration d'immunoglobulines spécifiques, appartenant aux trois classes IgG (G₁, G₂), IgM, IgA.

Les macroglobulines IgM apparaissent les premières, et sont décelées 8 – 10 jours après le début clinique, et les titres des deux classes d'immunoglobulines IgG et IgM s'élèvent ensemble pendant le premier mois de la phase aiguë de la maladie. Peu à peu, les IgG prédominent dans les phases plus tardive de l'infection aiguë et subaiguë. Dans la brucellose chronique, les IgM ont disparu tandis que les IgG persistent [10]. Quant aux IgA, elles sont présentes sous forme sécrétoire [2]. Mais on peut également ne trouver aucun anticorps décelable dans les sérums des malades atteints de brucellose chronique [1].

V-8-2- Réponse cellulaire :

Lors d'une infection par *Brucella*, on observe également le développement d'une immunité à médiation cellulaire (IMC). Cette réponse est exclusivement dirigée contre les protéines, contrairement à la réponse humorale, qui lors d'une infection par *Brucella*, est dirigée à la fois contre le LPS et contre les protéines bactériennes [3].

V-9- Diagnostic :**V-9-1- Diagnostic clinique :**

Tous les avortements bovins devraient être considérés comme une suspicion de brucellose et faire l'objet d'analyses. Ce signe n'est nullement pathognomonique, mais l'histoire du troupeau peut orienter dans un tel cas [22].

Les symptômes de la brucellose apparaissent tardivement et sont peu spécifiques et ne permettent pas une identification sans équivoque des individus atteints [3]. Le symptôme cardinal étant l'avortement et/ou la rétention placentaire, peut aussi être provoqué par d'autres agents pathogènes.

Vu la longue période asymptomatique, ainsi que la nature sub-clinique de la maladie chez la plupart des animaux, le diagnostic de la brucellose est principalement un diagnostic de laboratoire [3].

V-9-2- Diagnostic de laboratoire :**➤ Diagnostic bactériologique :**

Le diagnostic bactériologique a pour but la mise en évidence de la bactérie. La mise en évidence des *Brucella* est indispensable, et elle doit être entreprise dans tout groupe d'animaux dont le statut infectieux n'est clairement établi [3]. La présence de *Brucella* dans les échantillons biologiques peut être suspectée par une coloration suivie d'un examen microscopique, mais le résultat qu'il soit positif ou négatif, doit être confirmé par culture. En effet, un résultat positif ne constitue qu'une suspicion de brucellose, car *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q et *Chlamydia psittaci* ou *C. pecorum*, agents de la chlamydie peuvent donner en coloration de STAMP des images similaires [57]. L'isolement de *Brucella* se fait sur un milieu sélectif pour inhiber la croissance d'autres organismes que *Brucella*. L'isolement d'une colonie est suivi des tests biochimiques qui indiquent son appartenance au genre *Brucella* [3].

➤ Diagnostic sérologique :

On peut arbitrairement séparer en deux groupes les tests visant à mettre en évidence l'immunité humorale induite par une infection par *Brucella*. On distinguera d'une part les tests classiques, encore appelés « secondaires », parce qu'ils dépendent de la capacité des anticorps à réaliser une fonction immune (agglutination, fixation de complément, ELISA), d'autre part, les tests « primaires » qui ne nécessitent que la reconnaissance de l'antigène [3]. Ces tests ont été et sont toujours couramment utilisés pour le dépistage de la brucellose chez l'homme et les animaux [54].

La réponse humorale est aussi qualitativement variable (évolution des isotypes). On comprend donc facilement qu'aucun test ne permette à lui seul de détecter tous les animaux infectés [56].

V-9-3- Diagnostic biologique :

Le diagnostic biologique est la recherche de l'hypersensibilité retardée (HSR) ou épreuve cutanée allergique.

L'allergie brucellique se cherche par intradermoréaction, pour laquelle de nombreuses substances ont été proposées [1]. Il est impératif d'utiliser une préparation de brucelline définie et standardisée. La brucelline INRA qui est préparée à partir d'une souche rugueuse de *B.melitensis* répond à ces exigences et est une préparation commerciale équivalente est disponible [22].

L'épreuve cutanée à la brucelline dispose d'une spécificité très élevée qui permet de considérer comme infecté tout bovin non vacciné et séronégatif mais ayant réagi à l'épreuve cutanée allergique [41]. Cependant, certains animaux infectés ne présentent pas de réactions positives, ce qui conduit à ne pas recommander cette épreuve comme épreuve de diagnostic ou pour contrôle aux échanges internationaux [22].

➡ Protocole :

- 1) 0,1 ml de brucelline est injecté en intradermique dans le pli caudal, la peau du flanc ou sur le côté de l'encolure.
- 2) La lecture est effectuée après 48 à 72 h.
- 3) L'épaisseur de la peau au point d'injection est mesurée au centimètre à ressort avant injection et lors de la lecture.
- 4) Une réaction fortement positive est aisément identifiée par l'apparition d'une tuméfaction et d'une induration locale. Cependant, les réactions moyennes requièrent un examen attentif.

Un épaissement cutané de 1,5 à 2 mm doit être interprété comme une réaction positive.

Bien que l'épreuve cutanée allergique à la brucelline soit l'une des épreuves les plus spécifiques en brucellose (chez les animaux non-vaccinés), le diagnostic ne devra pas se limiter à l'observation d'un très faible nombre de réactions positives dans le troupeau, mais prendre également en compte les résultats des épreuves sérologiques. L'inoculation intradermique de brucelline peut induire une anergie temporaire (baisse de la réponse cellulaire). Aussi est-il généralement recommandé de laisser un intervalle de 6 semaines entre deux épreuves sur le même animal [22].

V-9-4- Diagnostic différentiel :

Chez l'animal, l'avortement, conséquence importante de la maladie, peut aussi être provoqué par d'autres agents pathogènes que *Brucella*, tel que *Trichomonas fetus*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira pomona*, *Listeria monocytogenes*, *Coxiella burnetii*, ainsi que divers champignons (genre *Aspergillus* et *Absidia*) et virus (de rhinotrachéite infectieuse bovine ou de la maladie des muqueuses) [56]. (Tableau V).

V-10- Traitement :

Brucella est sensible aux antibiotiques et notamment aux tétracyclines [3]. Les autres antibiotiques actifs sont la streptomycine, le chloramphénicol, la rifampicine et les sulfamides [1]. Le traitement de la brucellose bovine est théoriquement possible. Cependant, l'administration d'antibiotiques est rigoureusement interdite par les autorités sanitaires en raison de son coût prohibitif, du risque accru d'apparition de *Brucella* résistantes aux antibiotiques, dangereuses pour l'animal comme pour l'homme ainsi que l'absence de garantie quant au statut infectieux de l'animal traité [3].

V-11- Prophylaxie :

La prévention de la brucellose bovine est basée sur le **dépistage** des animaux malades, sur la **vaccination** et l'**éradication** des animaux reconnus positifs aux tests sérologiques.

➤ Dépistage des animaux malades :

Il est réalisé essentiellement par la sérologie : séro-agglutination lente, fixation de complément, épreuve à l'antigène tamponné. Signalons l'intérêt de la recherche des antigènes dans le lait par l'épreuve à l'anneau coloré (Ring test).

➤ La vaccination :

Les caractères d'un vaccin idéal sont :

- Induction rapide d'une immunité de longue durée ;
- Absence (ou minimum) d'interférences avec le diagnostic sérologique ;
- Production et conservation aisées et longue stabilité ;
- Absence (ou minimum) d'effets indésirables chez l'animal vacciné et innocuité totale pour l'homme.

Parmi les vaccins atténués, le vaccin préparé avec la souche B19 de *B.abortus*, a fait depuis longtemps la preuve de son efficacité chez les bovins et les ovins [1].

Le vaccin préparé de la souche 45/20 (*B.abortus*) s'avérant non agglutinogène a malheureusement révélé, lors de son utilisation, l'instabilité de la souche et sa tendance à retourner à une forme lisse et virulente [3].

Le vaccin RB 51 préparé d'une souche de *B.abortus*, n'exprimant pas une grande partie de la chaîne O du LPS, est reconnu comme vaccin officiel contre la brucellose bovine en USA depuis 1996 [64].

➤ *L'éradication :*

L'isolement et l'abattage précoce de tous les animaux reconnus brucelliques sont la seule solution efficace [17].

En outre de cette triade (dépistage, vaccination, éradication) il faut :

- Contrôler les animaux avant leur introduction dans un cheptel sain, et exiger qu'ils proviennent d'une exploitation indemne de brucellose.
- Eviter tout contact avec les animaux atteints ou suspects (voisinage, transactions commerciales...).
- Proscrire les pâturages communs.
- Eviter l'introduction des germes par divers agents de dissémination : épandage du lisier infecté, chiens déplaçant le placenta contaminé.
- Isolement des parturientes, la désinfection des locaux et du matériel, la destruction des matières virulentes, à savoir l'avorton et le placenta [17].

Tableau.IV : les principaux caractères cultureux et biochimiques des espèces du genre *Brucella*.

Espèce	Biovars	Exigence en CO ₂	Catalase	Oxydase	H ₂ S	Uréase	Hémolyse	Production d'indole	Croissance sur milieux contenant des produits suivants		
									Thionine(1)	FuchsiineO(2)	Safranine(3)
<i>B.abortus</i>	1	+(b)	+	+(b)	+	-	+	-	+	+	+
	2	+	+	+(b)	+	-	+	-	-	+	+
	3	+	+	+(b)	+	-	+	-	+	+	+
	4	+	+	+(b)	+	-	+	-	+(c)	+	+
	5	-	+	+(b)	-	-	+	+	+	+	+
	6	-	+	+(b)	-(b)	-	+	+	+	+	+
9	-	+	+(b)	+	+	-	+	+	+	+	
<i>B.suis</i>	1	-	+	+	+	-	+	-	+	-(d)	-
	2	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	3	-	+	+	+	-	+	-	+	-(d)	-
	4	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	5	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>B.melitensis</i>	1	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
	2	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
	3	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>B.ovis</i>		+	+	-	-	-	+	-	+	-	
<i>B.canis</i>		-	+	+	-	-	+	-	+	-	
<i>B.neotomae</i>		-	+	-	+	-	+	-	-	-	

+(b) : la plupart des souches présentent une réaction positive à ce test.

-(b) : la plupart des souches présentent une réaction négative à ce test.

(c) : certaines souches sont inhibées par la fuchsiine .

(d) : certaines souches sont résistantes à la fuchsiine et la safranine O.

CHAPITRE II :

**LES RÉTENTIONS PLACENTAIRES
ET LES AVORTEMENTS.**

1- GENERALITES :

1-1- Les annexes fœtales :

Les annexes fœtales sont les enveloppes qui isolent le fœtus dans un milieu liquide, le mettant à l'abri des variations de pression, l'isolant aussi parfaitement du milieu extérieur et le nourrissant [5]. Ces enveloppes sont de l'intérieur vers l'extérieur, l'amnios, la poche dans laquelle baigne le fœtus [5], l'allantoïde qui est un sac à paroi très mince en continuité avec la vessie de fœtus par le canal de l'ouraque [6], et le chorion, la plus externe couche, mince et transparente mais solide, sa face externe renferme une centaine de cotylédons fœtaux, plaques rondes et rougeâtres formées d'un grand nombre de villosités garnies de vaisseaux sanguins, ces villosités s'engrènent sur d'autres, situées elles sur les cotylédons de la muqueuse utérine [5]. Le prolongement de l'amnios et de l'allantoïde constitue avec les vaisseaux sanguins reliant le fœtus aux cotylédons, ce qu'on appelle le cordon ombilical, ce dernier est riche en eau dite gelée qui lors de la rupture empêche l'hémorragie [5]. (Figure 11 et 12).

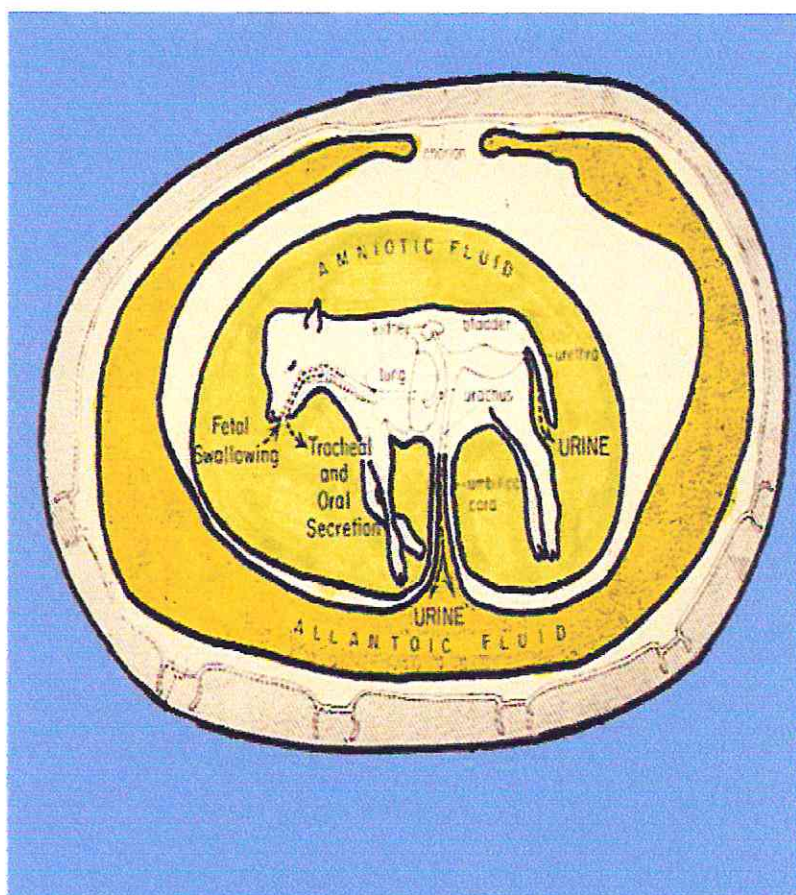


Figure 11 : Les enveloppes de fœtus des bovins [8].



Figure 12 : Photo d'un fœtus bovin et ses enveloppes [8].

Les annexes fœtales sont donc des formations chargées d'assurer la nutrition et la protection de fœtus. Elles sont expulsées lors de la mise-bas avec le fœtus ou peu après lui en même temps que la partie fœtale du placenta [7].

1-2 - La placentation :

La placentation est la mise en place du placenta. Ce dernier représente la zone de contact entre le chorion et l'utérus au travers de laquelle s'établiront les échanges de substances nutritives, de gaz et de métabolites [8].

1-2-2- Rôles du placenta :

On peut distinguer trois fonctions essentielles du placenta : une fonction métabolique, une fonction protectrice et une fonction sécrétrice endocrine [11].

- *Fonction métabolique :*

Le placenta permet le transport des nutriments maternels vers le fœtus et le transport des déchets du catabolisme fœtal en sens inverse [11]. Les nutriments maternels sont représentés par : l'eau, l'oxygène, les ions, les vitamines, le glucose,

les acides aminés et les acides gras indispensables à sa croissance. Quant aux déchets de catabolisme fœtal sont représentés par : le CO₂ et l'urée [5].

Concernant les Ac ça dépend du type de placenta, chez la femme par exemple les Ac maternels peuvent passer dans le sang de fœtus et le protéger durant les premiers mois de grossesse, avant qu'ils ne produisent les siens propres. Chez les ruminants par contre, le placenta cotylédonaire empêche le transfert des Ac de la mère au fœtus, le jeune bénéficie du colostrum qui est très riche en Ac [5].

- *Fonction protectrice :*

Le placenta constitue une barrière entre la mère et le fœtus. L'efficacité de cette barrière varie cependant avec sa nature, elle est d'autant plus efficace que le nombre de couches cellulaires séparant le sang de la mère du sang du fœtus est important [11].

- *Fonction endocrine :*

Le placenta est une glande endocrine complexe, capable de produire à la fois des hormones stéroïdes de type ovariens et des hormones protéiques de type hypophysaire [11]. Le placenta produit des œstrogènes, progestérones, PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin ou gonadotropine sérique de la jument gravide), son action est de type FSH-LH et il sécrète aussi la HCG (Human Chorionic Gonadotropin) [6].

1-2-3- Mécanisme de placentation chez la vache :

Le placenta est de type :

➤ **Cotylédonaire :**

De fait que les villosités choriales sont regroupées en cotylédons (figure 12).

➤ **Epithélio-choriale :**

Le chorion est appliqué contre l'épithélium de la muqueuse utérine [5]. De point de vue histologique, ce type de placenta explique l'existence de six couches histologiques interposées entre les deux circulations avec la lumière potentielle de l'utérus renfermant des sécrétions [6].

Le chorion s'attache à l'endomètre à partir de la cinquième semaine. L'épithélium utérin non gestant présente des élévations ovales et rondes, les caroncules (figure 13A), formées par une prolifération sous épithéliale des cellules conjonctives, elles sont au nombre de 70-140 et disposées en deux rangées dorsales et deux rangées ventrales

sur toute la longueur utérine. Au contact du chorion, ces caroncules utérines se développent sous la forme d'élevures convexes dont l'épithélium présente de nombreuses cryptes ramifiées. Au niveau de centre conjonctif de la caroncule, le système vasculaire se développe en conséquent. Du côté fœtal, les zones du chorion en contact avec les caroncules s'hypertrophient et mettent en place des villosités qui s'engrènent dans celles de la caroncule. Ces formations fœtales portent le nom de cotylédons. L'ensemble caroncule-cotylédon forme un placentôme [8]. (figure13B).

Les placentômes constituent les zones d'échanges fœto-maternels. On compte 50-100 placentômes de 3-5cm de diamètre chez la vache [11]. La surface totale est estimée à 130m [6].

La nutrition est histotrope en raison de la sécrétion par les glandes utérines, d'un lait utérin, se répand dans les intervalles entre les villosités participant à la nutrition de fœtus [5]. Le lait utérin est constitué principalement de lipides, de protéines et de débris cellulaires. Ce lait est absorbé par le trophoctoderme au niveau des zones aréolaires. L'épithélium maternel paraît être remplacé régulièrement, les débris de cellules étant phagocytés par le trophoctoderme foetal [8].

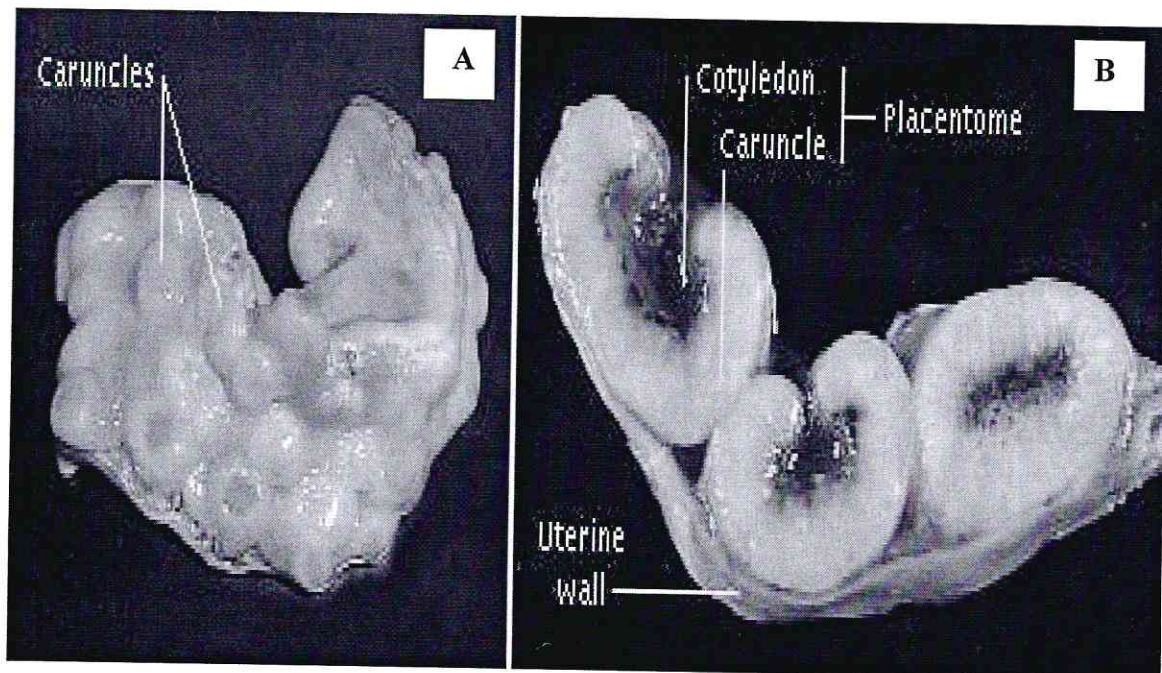


Figure 13 : **A** : Les caroncules maternelles. **B** : Les placentômes.
(www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/placenta/transport.html).

1-3- La délivrance :

1-3-1- Définition :

La délivrance ou l'expulsion des enveloppes est le premier événement puerperium. Elle correspond à la dissociation utéro-choriale qui est la conséquence de différents processus [13]. (figure 14B).

1-3-2- Mécanisme de délivrance :

➤ *Le décollement placentaire :*

Le déterminisme exact du décollement placentaire et de son expulsion n'est pas clairement établi. Il est vraisemblable que les modifications de l'équilibre hormonal survenant au moment de la mise-bas (Hypoprogésteronémie, hyperoestrogénémie, hyperprostaglandémie) ne sont pas totalement étrangères à ce phénomène. Une maturation déterminée du placenta, liée à l'équilibre hormonal, doit certainement être atteinte pour que surviennent le désengrènement placentaire [6].

La séparation entre les caroncules maternels et les cotylédons fœtaux s'opérant assez lentement, les échanges entre les circulations maternelle et fœtale se poursuivent jusqu'au moment de la sortie du fœtus, ceci explique la relative bonne survie du veau lors d'une mise-bas prolongée [11].

➤ *Processus de délivrance :*

Dès les derniers jours de la gestation, l'épithélium placentaire dégénère, les villosités se réduisent et les vaisseaux ont tendance à s'affaïsser [6]. Et suite à l'hémorragie provoquée par la rupture du cordon ombilicale on note la diminution du diamètre des villosités choriales [13].

Les contractions utérines jouent certainement un rôle important, très actives au cours de l'expulsion, elles se maintiennent après celle-ci et elles se produisent en vagues péristaltiques débutant à la partie apicale de la corne en direction du cervix.

Ces contractions ont pour effet de provoquer une inversion du chorion, la constriction vasculaire, l'ischémie et dès lors la dissociation des villosités cotylédonaires [6].

En fin, les enveloppes fœtales seront expulsées à la fois par le poids de leur portion déjà extériorisées et les contractions utérines [13]. Quant à la rapidité de cette expulsion, elle varie d'une espèce à une autre, chez la vache l'arrière-faix est normalement expulsé dans les 12 heures qui suivent le vêlage [6].

II- LES RETENTIONS PLACENTAIRES :

II-1-Définition et synonymies :

La rétention placentaire (RP) ou la non délivrance (ND), encore appelée rétention d'arrière-faix (RAF) est toujours définie comme étant l'absence d'expulsion des annexes fœtales de 12 ou 24 heures après le part [40, 62,63]. (figure 14A).

II-2- Fréquence et importance :

Les valeurs de la fréquence de la RP varient beaucoup d'une étude à une autre. Cela, est en grande partie dû au désaccord entre les auteurs sur le délai à considérer comme pathologique [42].

La fréquence de RP est comprise entre 3% et 32% avec une moyenne de 7% [40].

Cette fréquence est de 4%-18% [43]. Et peut être dépassé dans certaines conditions :

- Après une opération césarienne le taux de RP peut atteindre 21-38% [44].
- Plusieurs auteurs apportent que les vaches laitières sont les plus touchées, ceci est dû d'après eux qu'en système allaitant, le veau est laissé sous la mère, et les tétés répétées de celui-ci provoquent des décharges régulières d'ocytocine qui favorisent la délivrance au cours du post-partum [42].

La RP représente la troisième pathologie la plus fréquente après les mammites et les affections utérines [45].

Les pertes économiques directes ou indirectes (amaigrissement, chute de la production laitière, infertilité) qui font suite à la RP sont difficiles à chiffrer mais importantes [6].



Figure14 : (A) photo d'une vache présentant une rétention Placentaire.
(HANZEN 2004).



Figure14 : (B) délivrance normale d'une vache.
(HANZEN 2004).

II-3- Etiologie :

L'étiologie est plurivoque et comporte encore bien des inconnus. **Les placentites** spécifiques (brucellose, vibriose) ou non, provoquent la formation de l'exsudat qui, en s'organisant, détermine l'adhérence du chorion fœtal à la muqueuse utérine cotylédonaire [6].

- **Les modifications hormonales** de fin de gestation, leur importance sur la RP n'est pas établie, il semble cependant que le taux de progestérone se maintient à niveau trop élevé tandis que sont insuffisants les taux d'oestradiol et de prolactine. Chez les sujets atteints de RP ils n'existent pas de modifications des taux d'oestrogène et de β oestradiol [6].

- **L'inertie utérine** qui est fréquemment suggérée comme un facteur favorisant la RP [46]. Et cela à la suite de certaines affections telles que l'hydropésie des membranes fœtales, la torsion utérine et la présence de jumeaux, cette dernière s'accompagne de RP dans 50% des cas [6, 47]. A l'opposé une atonie utérine sans aucune autre cause de perturbation du processus de détachement de placenta ne peut être incriminée dans plus de 1-2% de tous les cas de RP [33].

- **L'hérédité** paraît jouer un certain rôle si l'on tient compte que ce trouble peut se reproduire chez le même individu et chez ces descendants [6].

- **Certaines carences** ont été invoquées : L'hypocalcémie, carence en vitamine A, iode, sélénium. Divers auteurs estiment que l'administration de 680 UI de vitamine E et 15 mg de sélénates de soude pendant les 18 jours qui précèdent le vêlage réduiraient de moitié la fréquence de la RP [47].

- **L'allongement de la gestation** : une durée de gestation supérieure à 290 ou 295 jours est associée à une RP en raison d'une aplasie ou d'une hypoplasie sévère de la glande surrénale ou du l'hypophyse du veau [48]. Lors de gestation prolongée, le tissu conjonctif cotylédonaire peut proliférer et en s'épaississant, enserrer les villosités choriales ce qui empêche la délivrance [67].

- **La réduction** naturelle ou induite de la longueur de gestation (avortement et accouchement prématuré) et la naissance simultanée d'un ou plusieurs veaux ou l'expulsion d'un veau mort entraînent plus fréquemment une RP [68].

- **Tarissement** : l'incidence de la RP augmente lorsque la période sèche dure moins de 5 semaines [48]. Les vaches dont la période sèche avait duré moins de 30 jours au cours de la première lactation ont présenté une fréquence plus élevée de RP lors du vêlage suivant [45].

Par ailleurs toute intervention obstétricale **sans une hygiène rigoureuse** augmente le risque de RP. Car elle est généralement suivie d'une expulsion prématurée du fœtus et d'une augmentation précoce de la contamination bactérienne de l'utérus. Ce type de situation accompagne le plus souvent un accouchement dystocique réalisé par les voies naturelles [66].

- **La saison** : la fréquence de ND et la saison n'ont pas de lien [69]. Alors qu'une incidence plus faible a été mise en automne et plus forte en période estivale, et qui peut être expliquée par un raccourcissement de la durée de gestation lié à un stress thermique induisant des modifications neuro-endocriniennes : une augmentation de la progestéronémie et une baisse de l'oestradiol [45, 67].

La fréquence des RP augmente également avec l'état d'embonpoint des animaux, à l'inverse, un état d'émaciation, reflet d'un mauvais état général, peut également s'accompagner de RP [45]

II-4- Pathogénie :

Les facteurs cités ci dessus interfèrent soit avec la séparation des microvillosités fœtales des caroncules maternelles et engendrent un échec de détachement du délivre, ou bien avec la contractibilité utérine et provoque ainsi un échec d'expulsion de celui-ci [46].

Notre étude se base sur la pathogénie de RP d'origine infectieuse particulièrement d'origine brucellique. Chez la vache, l'infection par *B.abortus* conduit à la RP qui accompagne souvent les avortements, elle constitue parfois le seul symptôme, surtout en cas de brucellose chronique.

Le tropisme génital des brucelles s'explique par la présence d'un facteur de croissance, l'*érythritol*, qui est produit dans l'utérus des bovins gestants, stimule la croissance de *Brucella abortus*. La grande concentration d'*érythritol* dans le placenta et les eaux fœtales pourrait expliquer la localisation de l'infection dans ces tissus [3].

Les brucelles se multiplient dans l'espace utero-chorial, entraînant une placentite exsudative et nécrotique. Ces lésions provoquent un décollement utero-chorial et des adhérences fibreuses entre placenta et utérus. Il paraît que ces adhérences expliquent la fréquence des RP chez les femelles infectées [17].

II-5- Traitement :

Devant une RP d'une vache suspecte de brucellose, on doit suivre la thérapeutique suivante :

- Avant tout, réaliser un prélèvement sanguin, l'envoyer au laboratoire, en attendant les résultats, on procède à :
- *La délivrance manuelle* :

Un traitement manuel ne doit être envisagé que si la vache ne présente pas de signes de complication (hyperthermie, dysorexie...). De plus, le désengrènement des cotylédons doit être facile et réalisé sans provoquer d'hémorragies ni de lésions de l'endomètre [46, 66].

Après avoir pratiqué une asepsie rigoureuse de la région vulvaire et périnéale de la vache, l'opération sera réalisée mains gantées. La partie d'arrière-faix extériorisée servira de fil conducteur à la main pour pénétrer dans l'utérus, et chaque cotylédon non désengréné sera pressé à la base entre le pouce et l'index et on y ajoutera un léger mouvement des doigts comme si l'on devait faire sortir un bouton d'une boutonnière [6] (figure 15A). C'est un mouvement de levier pour séparer de la caroncule maternelle un bord de cotylédon fœtal, le désengrènement est ensuite complété en passant le pouce sur toute la surface entre la caroncule et le cotylédon ce qui libère ce dernier [65] (figure 15B).

On procède ainsi pour tous les cotylédons et on les détache, rangé par rangé et d'arrière en avant [6].

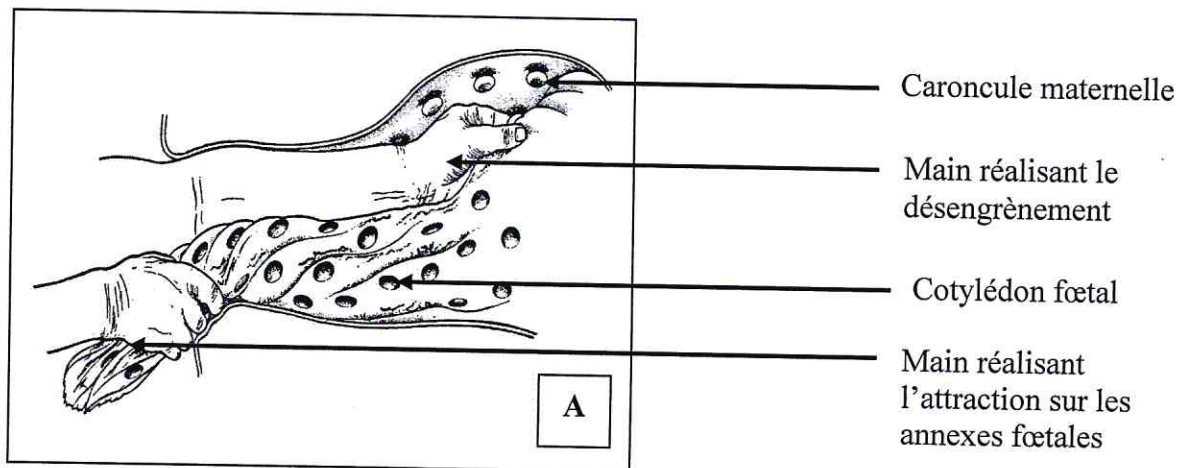


Figure 15:

A : schématisation de l'utérus de vache et des mains de l'opérateur lors de délivrance manuelle.
B : désengrènement manuel des cotylédons. (HANZEN 2004).

En général, lorsqu'un nombre suffisant de cotylédons est ainsi désengrené, la simple attraction sur les annexes permet le détachement du reste des cotylédons et l'extraction totale du délivre [65].

On s'assure que l'opération est complète en étalant les enveloppes, puis on pratique une nouvelle exploration utérine. Il nous paraît personnellement utile de réaliser à ce moment une légère irrigation antiseptique de manière à obtenir l'élimination des lochies et la rétraction utérine [6].

- Si le placenta n'est pas visible à l'extérieur (rétention complète), l'opération est plus délicate et doit débuter par le désengrènement des cotylédons les plus proches du col, et l'extraction des annexes ainsi libérées qui seront ensuite torsadées [72].
- En général quand il s'agit de brucellose, le laboratoire renvoie le plus vite possible le résultat, et à ce moment on déclare la vache auprès des autorités et on ordonne son envoi à l'abattage.

III- LES AVORTEMENTS :

III-1- Définition :

L'avortement consiste dans l'interruption de la gestation avec expulsion d'un fœtus non viable ou d'un fœtus mort. L'avortement se différencie de l'accouchement prématuré par le fait que celui-ci réside de l'expulsion, avant terme, d'un fœtus viable [6].

Les avortements peuvent avoir des causes variées, ils sont causés par les agents infectieux (parasites, champignons, bactéries ou virus), les agents non infectieux (traumatiques, toxiques...) et enfin, on a les avortements provoqués.

Et notre étude s'intéresse aux avortements infectieux et plus particulièrement à ceux dus à *Brucella*.

III-2- L'avortement brucellique chez les bovins :

L'avortement constitue la principale, voire la seule manifestation clinique de la brucellose. Selon (HENZEN 2004), 80% des animaux exposés au germe (*Brucella abortus*) avortent (figure 16).

III-3- Mécanisme de l'avortement brucellique :

Plusieurs études suggèrent que le LPS de *Brucella* serait l'agent responsable de l'avortement. Chez les bovins et les ovins, l'infection du fœtus entraînerait une

augmentation du taux du cortisol foetal conduisant à un « shift » hormonal responsable à son tour de l'avortement ou de la mise bas prématurée [3].

La gestation est, chez certaines espèces animales un important facteur de sensibilité. La multiplication des brucelles dans l'espace utéro-chorial entraine une placentite exsudative et nécrotique. Ces lésions provoquent un décollement utéro-chorial et des adhérences fibreuses entre placenta et utérus. Si ces lésions sont étendues, elles sont responsables d'une interruption des échanges nutritifs entre la mère et son foetus; le foetus meurt d'anoxie et il y a avortement.

Des brèches peuvent permettre le passage de *Brucella* dans la cavité amniotique; les bactéries sont alors ingérées par le foetus et provoquent une septicémie mortelle entraînant l'avortement.

Après avortement (ou mise bas apparemment normale), la vidange de l'utérus et son involution provoque la disparition progressive des *Brucella*, incapables de se multiplier et persister dans l'utérus au repos. Ex : chez les bovins, la durée maximale d'excrétion des *Brucella* est à trois semaines environ.

Les bactéries persistent néanmoins dans les ganglions annexes de l'utérus et d'autres sites de l'organisme. Aux gestations suivantes, on constatera une réinvasion de l'utérus gravide, mais le plus souvent non suivi d'avortement. Il y a donc une certaine résistance locale limitant l'intensité de la multiplication bactérienne et les seuls symptômes observés sont des rétentions placentaires et des stérilités transitoires parfois décrites en période de brucellose chronique. Même à ce stade, en l'absence d'avortement, la femelle continue à disséminer transitoirement les *Brucella* à l'occasion de la vidange utérine [17].

Le tableau (V) nous illustre un diagnostic différentiel de l'avortement brucellique avec les autres avortements qui sont dus à des étiologies diverses, qui posent souvent un problème de confusion.



Figure16: Avorton brucellique de bovin (8 mois). On ne remarque aucune lésion spécifique sur l'avorton [19].

Tableau V: Tableau résumant le diagnostic différentiel entre les maladies abortives chez les bovins. (BLOOD-HENDERSON. Médecine vétérinaire)

Maladie	Aspect clinique	Taux d'avortement	Epoque d'avortement	Examen clinique		Diagnostic de laboratoire	
				Placenta	Fœtus	Isolément du germe	Sérologie
Brucellose (<i>brucella abortus</i>)	Avortement, RP, très fréquente.	Elevé jusqu'à 90% dans les effectifs sensibles	6 mois et plus..	Nécrose des cotylédons, placenta épais de la consistance du cuir et œdémateux	Pneumonie, parfois nécrose des différents organes, parfois méningite, granulomatose	Culture du contenu stomacal du fœtus, du placenta, liquide utérin, lait, sperme.	ELISA,EAT,SAW,FC,RT
Chlamydie (<i>C abortus</i>).	Avortement, trouble de reproduction, troubles respiratoires, nerveux et digestifs, orchio-épididymite et artrites chez le male.	Elevé de 25-75%.	Dernier tiers de gestation	Epais, œdémateux. Cotylédons hyper-hémiques ou nécrotiques.	Faible autolyse de l'avorton.	Isolément et culture sur milieux spécifiques. Ecouvillonnage vaginal réalisé le jour de l'avortement.	PCR, FC, ELISA.
Trichomonose (<i>T.foetus</i>).	Infertilité, retour des chaleurs au-delà de 4-5 mois, avortement et pyromètre.	Modéré 5-30%.	2-4 mois.	Liquide avec floculas, liquide clair et séreux dans l'utérus.	Macération du fœtus de très petite taille.	Examen de la goutte pendante ou de la culture à partir de l'estomac fœtal et de l'exsudat utérin dans les 24 heures après avortement.	Epreuve d'agglutination sur le mucus vaginal

Maladie	Aspect clinique	Taux d'avortement	Epoque d'avortement	Examen clinique		Diagnostic de laboratoire	
				placenta	fœtus	Isolement du germe	sérologie
Leptospirose (<i>L. Pneumonia</i>)	Avortement qui peut se produire au cours du stade aigue fébrile, plus tard ou sans rapport avec la maladie.	25-30%.	Tardive, 6 mois et plus.	Placenta atonique, avasculaire, cotylédons jaunes brins, œdème brin et gélatineux entre l'amnios et l'allantoïde	Mort courante du fœtus, nécrose tubulaire multifocale, méningite non suppurative.	A partir du liquide pleural, des reins et du foie du fœtus.	Sérum positif à l'épreuve d'agglutination, 14-21 jours après la période fébrile.
Mycose <i>Aspergillus. Absidia</i>		Inconnu, représente 6-7% de tous les avortements.	3-7 mois.	Nécrose des cotylédons maternels, adhérence au matériel nécrosé de cotylédons chorioniques amène une apparence de coussinet mou de couleur jaune.	Peut être petit, lésions élevées, moles ou diffuses et blanches sur la peau, ressemble à la teigne.	Examen direct des cotylédons, de l'estomac fœtal pour la recherche des hyphes, examen des cultures.	
Listériose (<i>L. Monocytogène</i>).	Encéphalite, paralysie faciale unilatérale, somnolence, conjonctivite.	Bas.	Environ 07 mois.	Placentite oedémateuse.	Autolyse, lésions nécrotiques punctiformes sur le foie.	Germes dans l'estomac fœtal,	Titre d'agglutination supérieure à 1/400 (considéré positif) chez les sujets en contact.

Maladie	Aspect clinique	Taux d'avortement	Epoque d'avortement	Examen clinique		Diagnostic de laboratoire	
				placenta	fœtus	Isolément du germe	sérologie
Avortement épizootique viral.	Surtout en hiver, une immunité apparaît dans le troupeau.	Elevé 30-40%.	6-8 mois.	Négatif.	Œdème sous cutané, ascite, pétéchies sur l'œsophage et dans la trachée, lésions dégénératives de foie.	Isolément d'une chlamydia.	Pas d'épreuves Précises. itres d'agglu
Rhino trachéite infectieuse bovine.	Avortement, jetage nasal, ptyalisme, bronchite, pneumonie, métrite, encéphalite.		4-7 mois.	Placentite.	Nécrose focale du foie, des ganglions, nécrose rénale, œdème hémorragique.		
Maladie des muqueuses.	Infertilité, anomalie congénitale, diarrhée aigue et néonatale.		1-2 mois.	Parfois placentite. Lésions œdémateuses et hémorragiques, hypertrophie de la rate et des ganglions lymphatiques.			
Iso-immunisation de gestation.	N'a jamais été observé à l'état naturel chez la vache. A été produite expérimentalement par des injections en IV répétées du sang d'un veau. Il se produit une hémolyse intra vasculaire chez le veau.						
Nutritionnelle.	L'ingestion de quantités excessives de substances œstrogènes préformées dans le fourrage peut provoquer l'avortement et s'accompagne généralement d'une augmentation de la vascularisation de la mamelle et de la vulve. Il est possible qu'un facteur alimentaire soit en cause dans l'avortement des « des terres basses ».						

CHAPITRE III :

**LES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC
SÉROLOGIQUE DE LA
BRUCELLOSE.**

I-GENERALITES :

Le diagnostic certain d'une infection brucellique exige l'isolement et l'identification de la bactérie. Cependant, l'examen bactériologique n'est pas toujours praticable, spécialement sur les sujets vivants [16].

Bien que les examens bactériologiques permettent la mise en évidence de l'agent infectieux par culture puissent jouer un rôle important dans la lutte contre la brucellose, leur emploi est demeuré limité car les examens bactériologiques nécessitent un niveau de compétence plus élevé et font appel à des techniques plus sophistiquées que les épreuves sérologiques [15].

Les tests sérologiques dépendent d'une réaction entre un antigène (Ag) brucellique et des anticorps (Ac) produits lors d'une infection [16].

Aucune épreuve sérologique n'est, à elle seule, appropriée à toutes les situations épidémiologiques, toutes les épreuves présentent des limites, notamment par le diagnostic individuel [20,21]. On doit donc prendre en considération tous les facteurs pouvant influencer sur les valeurs d'une épreuve et/ou des résultats d'une épreuve avant interprétation et application au diagnostic.

On procède dans ce présent chapitre à l'étude des différentes méthodes sérologiques qui correspondent à des méthodes standardisées et validées dont les performances permettent de les qualifier comme « épreuves prescrites » ou « épreuves alternatives » pour les échanges internationaux [22].

Les performances diagnostiques de certaines méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) et de polarisation de fluorescence (FPA : fluorescence polarisation assay) sont analogues voire supérieures à celle de la fixation de complément (FC) et dès lors qu'elles sont plus robustes et techniquement plus simples à mettre en œuvre, leur emploi peut être préféré [23,24].

Pour la surveillance de la brucellose à un niveau national ou régional, les épreuves de l'Ag tamponné de *Brucella* (BBATs :Buffered *Brucella* antigène tests), c'est-à-dire l'épreuve du Rose bengale (RB : dénommée plus communément épreuve à l'Ag tamponné ou EAT) et le BPAT (Buffered plate agglutination test) de même que l'ELISA et le FPA, sont des épreuves de dépistage adéquates .

Les sérums ayant présenté un résultat positif doivent être testés à nouveau en suivant une stratégie de confirmation adaptée [22].

II- METHODES SEROLOGIQUES DU DIAGNOSTIC :

II-1- Epreuves à l'antigène tamponné de *Brucella* : (BBATs ou *Buffered Brucella antigène tests*) :

2-1-1- Epreuve du Rose Bengale (RB) ou épreuve à l'antigène tamponné (EAT) :

Cette épreuve est une simple agglutination rapide utilisant un Ag coloré au Rose Bengale et tamponné à un pH bas, habituellement de 3.65 +/- 0.05 [26]. Cette agglutination se fait par interaction avec les Ac sériques, c'est une **épreuve qualitative** qui permet de révéler les IgG1 et les IgM et également les IgG2 [17,15].

Le test au RB se fait en mélangeant une goutte d'Ag à une goutte de sérum afin d'observer la réaction d'agglutination. Le transport de cet Ag peut poser des problèmes car il se détruit assez rapidement à la température ambiante. Le test est aussi affecté par la température à laquelle il est pratiqué. Pour toutes ces raisons on obtient des résultats plus précis et plus facilement reproductibles si on l'utilise au laboratoire que sur le terrain. En outre, au laboratoire il est possible de respecter certaines normes pour l'interprétation des résultats [15].

Les détails de manipulation dont : le matériel, le mode opératoire ainsi que l'interprétation des résultats seront étudiés dans la partie expérimentale.

2-1-2- Epreuve d'agglutination en plaque tamponnée (*Buffered plate agglutination test, BPAT*) :

Le BPAT est utilisé comme un screen test avec le Rose Bengale [16]. L'Ag de BPAT est préparé à partir de *Brucella abortus* S1119-3 conformément au protocole décrit par Angus et Barton [27].

On mélange 80µl de sérum à 30µl de l'Ag sur une plaque de verre sur laquelle sont dessinés des carrés de 4cm sur 4. Une fois le mélange effectué, on applique trois fois à la plaque un mouvement par inclination de manière à obtenir un mélange homogène, puis on la place 4min dans une chambre humide, la plaque est ensuite sortie et de nouveau agitée comme indiqué ci-dessus puis replacée en chambre humide pour 4min, à cet instant, on sort la plaque, on l'agite à nouveau et on effectue la lecture de la réaction [16].

Toute agglutination visible doit être considérée comme une réaction positive. Comme l'EAT, cette épreuve est très sensible et détecte aisément les Ac induits par la vaccination. Aussi toute réaction positive doit être confirmée au moyen d'épreuves complémentaires [22].

II-2- Test de fixation de complément (FC) :

Bien qu'elle soit de mise en œuvre plus complexe, qu'elle nécessite un bon équipement de laboratoire et un personnel suffisamment entraîné au titrage précis et à l'entretien des réactifs, la FC est une épreuve très largement utilisée et acceptée comme épreuve de confirmation [22].

Chez les ruminants, la FC a l'avantage d'être relativement insensible aux Ac vaccinaux produits par les animaux auxquels ont été injectés des vaccins vivants atténués, préparés à partir de la souche B19 de *Brucella abortus*. En revanche, cette épreuve présente une grande sensibilité vis-à-vis des Ac brucelliques produits par les animaux naturellement infectés, pour lesquels elle constitue un test hautement spécifique [15].

La FC est la réaction de mise en évidence **quantitative** d'Ac fixant le complément par interaction avec un Ag brucellique, elle détecte les IgG1 et éventuellement les IgM [17].

Les détails concernant le test de FC sont fournis en annexes.

II-3- Méthodes immuno-enzymatiques :

Le test immuno-enzymatique le plus utilisé est l'ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) indirect, qui vise à mettre en évidence la présence d'Ac anti-LPS dans le sérum ou dans le lait, il est plus sensible que le test de FC mais moins spécifique que celui-ci. C'est le test qui donne les résultats de la façon la plus précoce mais à l'instar des autres tests sérologiques, il ne permet pas de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés [3].

II-4- Test de polarisation de fluorescence (FPA : fluorescence polarization assay) :

Ce test a été récemment mis au point au Canada. Il s'est révélé intéressant lors d'études de terrain, principalement réalisé en Amérique latine [34]. Il s'agit d'une technique simple et rapide pouvant être pratiquée au laboratoire ainsi que sur le terrain.

Le principe de l'épreuve est fondé sur la rotation aléatoire des molécules en solution. La taille moléculaire est le facteur influençant le plus le taux de rotation, qui lui est inversement relié. Si une molécule est conjuguée à un fluorochrome, la vitesse de rotation à travers d'un angle de 68.5° peut être déterminé par la mesure de la densité de lumière polarisée dans les plans vertical et horizontal. Ainsi une grosse molécule émet plus de lumière dans un plan polarisé qu'une petite molécule tournant plus vite et émettant plus de lumière dépolarisée [22].

Pour le diagnostic de la brucellose, on ajoute un fragment de petite masse moléculaire (en moyenne 22KDA) de l'OPS du LPS-S de *Brucella abortus* conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine est utilisée comme Ag qui est ajouté au sérum dilué ou au sang total. La mesure de

taux d'Ac est obtenue en environ 2min pour le sérum ou 15 secondes pour le sang au moyen d'un lecteur de polarisation de fluorescence [28].

II-5- Epreuve de séro-agglutination lente en tube ou séro-agglutination de Wright (SAW) :

Epreuve quantitative d'Ac agglutinants par interaction avec un Ag brucellique, elle révèle les IgG2 et les IgM [17]. Cette méthode a été mise en évidence par Wright en 1897, la plus ancienne méthode de diagnostic [3].

Bien qu'elle ne soit reconnue, ni comme épreuve prescrite, ni comme épreuve alternative, la SAW a été utilisée avec succès pendant de nombreuses années à l'occasion de programmes de surveillance et d'éradication de la brucellose bovine, sa spécificité est singulièrement améliorée par l'addition l'EDTA à l'Ag [29,30,31]

La SAW est la réaction la plus précocement positive, elle est donc une bonne méthode de diagnostic de la brucellose humaine aigue, mais elle est parfois défailante et en particulier se négative rapidement, parfois dans la forme subaiguë et presque toujours dans la brucellose chronique et chez les anciens brucellisés [1].

Bien que l'utilisation de ce test soit découragée au plan international, il est toujours utilisé en Afrique de sud. Il permet dans une certaine mesure de différencier une réaction sérologique vaccinale consécutive à une vaccination au vaccin B19, d'une infection par *Brucella abortus* [3].

II-6- Epreuves de l'Haptène natif ou au poly B :

Les épreuves à l'Haptène natif (HN) ou au poly B sont des épreuves de confirmations qui ont été utilisées avec succès dans un programme d'éradication en association avec l'EAT comme épreuve de dépistage [22]. La sensibilité optimale est obtenue dans un système d'immuno-diffusion radiale inverse (RID) dans lequel le sérum diffuse dans un gel hypertonique contenant le polyoside [35]. Néanmoins, la procédure de la double diffusion en gel est également utile [36.37]. Les veaux vaccinés par voie sous cutanée avec la dose standard de B19 à l'âge de 3-5 mois sont négatifs 2 mois après vaccination. Les bovins adultes vaccinés 4-5 mois plutôt par voie sous cutanée avec la dose réduite de B19 ne sont positifs que s'ils se sont infectés et excrètent le vaccin dans leur lait [38].

La vaccination conjonctivale (chez le jeune ou l'adulte) réduit le délai nécessaire pour obtenir un résultat négatif avec les épreuves à l'Haptène natif ou au polyB. La corrélation entre résultat positif et excrétion de *Brucella* est une caractéristique notable de RID. Ceci a été montré aussi bien chez les bovins expérimentalement infectés [38] que chez les animaux naturellement infectés sous traitement antibiotique [39].

II-7- Test réalisé sur le lait (Test de l'anneau ou Ring test (RT)) :**• Objectif :**

Le test de l'anneau ou Ring test (RT) est largement utilisé en vue de dépistage de la maladie dans les exploitations [12]. C'est une épreuve simple, effectuée sur les laits de grand mélange collecté dans les livraisons en vrac. Ce test est également très utilisé dans les enquêtes épidémiologiques, les programmes de lutte, la surveillance des troupeaux et l'élimination des animaux atteints. Il est recommandé de soumettre le lait de chaque troupeau à un RT tous les trois mois, pour assurer la surveillance des troupeaux, sauf dans les zones indemnes, l'intervalle entre deux contrôles peut être augmenté [15].

• Principe :

La méthode consiste à ajouter une goutte d'Ag, coloré à l'hématoxyline, à un millilitre de lait versé dans un tube étroit puis à mélanger le tout avant de laisser reposer ce mélange jusqu'à ce que la crème soit remontée à la surface [15]. Il faut s'assurer que l'Ag est bien mélangé avec le lait, incuber à 37°C pendant une heure [16]. Dans le cas d'un prélèvement positif, l'Ag s'est agglutiné et adhérent aux globules graisseux du lait, s'est regroupé en surface dans l'anneau de crème qu'il colore en bleu. La colonne de lait sans crème située au dessous retrouve, totalement ou partiellement sa couleur blanche d'origine. Dans le cas d'un prélèvement négatif, l'Ag reste dispersé dans la colonne de lait écrémé qu'il colore en bleu et l'anneau de crème reste blanc [15].

Le RT est la réaction d'agglutination **qualitative** obtenue par l'interaction des Ac contenus dans le lait (IgM, IgG1 et surtout les IgA) avec l'Ag coloré par l'hématoxyline [17].

• Limites d'utilisation :

- ❖ L'épreuve n'est pas efficace avec du lait pasteurisé.
- ❖ Les résultats les plus fiables et les plus faciles à reproduire sont obtenus avec des laits ayant été conservés au frais de 48-72 heures.
- ❖ L'épreuve est conçue pour être utilisée sur des laits de mélange, c'est-à-dire dilués. Le lait provenant d'un seul animal doit être dilué dans un autre lait présentant une réaction négative avant d'être soumis au RT.
- ❖ Le RT standard est efficace sur des laits de mélange provenant de troupeaux dont la taille peut aller jusqu'à 200 vaches laitières.

- **Matériel :**

- ❖ *L'antigène :*

L'Ag est constitué par une suspension de cellules de *B abortus* tuée par la chaleur et colorées avec une solution d'émathoxyline. La concentration cellulaire devant être amenée à 4%. Le PH de l'Ag doit être réglé à une valeur comprise entre 4 - 4,3 [15].

- ❖ *Compte-gouttes :*

Un compte-gouttes est toujours fourni avec l'Ag permettant d'instiller des gouttes de 0,03 ml si nécessaire, un tel compte-gouttes peut être fabriqué avec une pipete Pasteur ou avec une aiguille à injection hypodermique épointée. Les compte-gouttes fabriqués de façon artisanale doivent être convenablement contrôlés avant d'être utilisés dans les rings tests [15].

- ❖ *Prélèvements des échantillons de lait :*

Avant de prélever un échantillon, il convient de bien mélanger le lait contenu dans les bidons ou les citernes de stockage afin de s'assurer que la crème est uniformément répartie.

La méthode la plus pratique pour effectuer les prélèvements consiste à utiliser une petite louche métallique qu'il sera nécessaire de nettoyer soigneusement chaque fois. On ajoute 1ml de lait dans un petit tube ou une petite bouteille dans lesquels ont été préalablement ajoutées 0,5ml de solution formolée agissant comme conservateur [15].

- **Mode opératoire :**

- 1- Préparer une série de petits tubes d'une capacité égale à 2ml.
- 2- Ajouter chaque échantillon de lait afin de répartir la crème de façon uniforme dans le mélange.
- 3- Mettre 1ml de chaque prélèvement de lait successivement dans la série des tubes.
- 4- Ajouter une goutte (0.03ml) d'Ag dans chaque tube.
- 5- Mélanger soigneusement le lait et l'Ag dans chacun des tubes en les retournant plusieurs fois.
- 6- Après avoir effectué ce mélange dans le dernier tube, vérifier l'ensemble des tubes afin de s'assurer que l'Ag et le lait forme bien un mélange homogène.
- 7- Laisser incuber les tubes à 37°C pendant une heure.

- **Lecture des résultats :**

Le ring test est positif lorsque la couleur bleue est plus intense dans l'anneau de crème que dans la colonne de lait sans crème située au-dessous. Il est possible d'attribuer aux résultats différents degrés de positivité. [15].

- **Interprétation des résultats :**

Un résultat positif sur un échantillon est la preuve que la brucellose a infecté certains des animaux ayant contribué au lait de mélange [15]. Des réactions faussement positives peuvent survenir en cas de mammites ou en cas de la lactation débutante lorsque le lait surit ou en cas de vaccination récente au vaccin B19 [3]. Mais aussi la présence de vaches en périodes de tarissement, ces problèmes ne se posent en général que dans le cas d'échantillons prélevés sur des laits de mélange provenant d'un petit nombre d'animaux [15].

III- LES REACTIONS SEROLOGIQUES CROISEES :

Lors des tests sérologiques visant la recherche des Ac produits contre l'infection brucellique, on peut détecter des Ac produits par d'autres bactéries et par conséquent on aura des résultats faux positifs. Cela est expliqué par le fait que les Ac détectés sont pour la plus part dirigés contre les épitopes portés par le LPS [55]. C'est la parenté antigénique entre *Brucella* et d'autres bactéries due à la similarité plus ou moins grande de leurs chaînes O respectives qui pose un problème en dépistage sérologique. Cette parenté génétique a été décrite pour *Yarsinia entérocolitica* O : 9, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O : 159, *Salmonella urbana* et *pseudomonas maltophilia* [59].

Actuellement, en Europe, *Y. enterocolitica* O : 9 est régulièrement isolée des matières fécales de bovins présentant des réactions sérologiques faussement positives dans les tests de dépistage de la brucellose bovine [55, 60, 61].

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I- PROBLEMATIQUE ET OBJECTIF:

La brucellose bovine sévit de façon enzootique sur une bonne partie du territoire algérien et cela malgré les programmes de lutte visant son éradication. La défaillance de ces programmes est due entre autres à la négligence et à la non déclaration par les vétérinaires des cas suspects, à la faible indemnisation de la valeur réelle de l'animal et surtout à l'existence des cheptels non répertoriés s'agissant le plus souvent des troupeaux extensifs échappant aux campagnes de dépistage.

Cette maladie se manifeste cliniquement, le plus fréquemment par un avortement au dernier tiers de gestation ou une rétention placentaire.

Notre étude a cerné deux régions : la Daira de M'Chedalah (W. Bouira) et la Daira de Tazemalt (Bejaia), pour l'année 2007-2008, où nous avons constaté une prédominance des élevages bovins extensifs avec une fréquence relativement élevée des avortements et des rétentions placentaires.

Nous nous sommes fixés deux objectifs :

- ▶ Connaître la situation de la brucellose bovine dans ces régions.
- ▶ Etablir une corrélation entre les vaches suspectes de brucellose et la sérologie.

II- MATERIELS ET METHODES:

Le but de notre étude est d'essayer de faire une corrélation entre les symptômes de suspicion de la brucellose détectés chez les bovins et les résultats de la sérologie de ces mêmes animaux. Les vaches de notre étude étaient de races et âges différents ayant présenté des avortements au dernier tiers de gestation ou des rétentions placentaires, nous nous sommes intéressées surtout aux vaches en élevage extensif.

A) Fiche de renseignements :

Nous avons élaboré une fiche de renseignements individuelle pour chaque vache prélevée, qui contient des informations relatives à l'animal lui-même ainsi que son élevage.

Description :

C'est une fiche en une seule page qui suit le plan suivant :

- Nature du troupeau ;
- Type l'élevage ;
- Race de la vache ;
- Identité de la vache ou nom du propriétaire si l'identification fait défaut ;
- Antécédents de la vache aux vêlages, avortement ou RP ;
- Nature du prélèvement et résultat du laboratoire ;(Voir annexe)

B) Observations cliniques :

Au total 21 cas de suspicion de la brucellose clinique (Avortements, rétentions placentaires) ont été détectés sur la période allant de Juin 2007 au Mai 2008.

C) Prélèvement :

Les prélèvements sont effectués sur des cheptels non vaccinés des deux Daïras Tazmalt (Béjaia) et Mchedellah (Bouira). Nous nous sommes intéresser qu'aux vaches qui ont présenté les symptômes de suspicion de la brucellose (Avortement au dernier tiers de gestation avec ou sans rétention placentaire et aux cas uniquement de rétention placentaires).

Sur ces animaux nous avons effectué une prise de sang dans le but de confirmation ou d'infirmer de notre suspicion.

1- Matériels pour réaliser le prélèvement sérologique :

- Blouse.
- Bottes.
- Gants en latex

- Alcool pour la désinfection
- Vacutainers secs.
- Aiguilles
- Porte tube
- Glacière

2- Méthode du prélèvement :

Après contention de l'animal, on exerce une pression sur la région de la veine jugulaire et après désinfection avec l'alcool et grâce à une aiguille on effectue une prise de sang sur tube sec, ensuite nous inscrivons sur l'étiquette du tube la date du prélèvement, le numéro de la boucle de la vache ou le nom du propriétaire et son adresse si la vache n'a pas de boucle.

Les prélèvements sanguins sont inclinés dans le porte tube et seront gardés au frais dans la glacière pour être acheminé le jour même au laboratoire de Draâ Ben Kheda.

D) Méthodes de diagnostic sérologique effectuées par le laboratoire de Draâ Ben Kheda :

Les méthodes de diagnostic de la brucellose utilisées au laboratoire régional de DBK sont de deux types : une épreuve qualitative et d'orientation qui est l'EAT (Epreuve à l'Antigène Tamponné) encore dit test au Rose Bengale (RB) et une épreuve quantitative s'agissant de la réaction de FC (Fixation du Complément), celle-ci étant utilisée comme test de confirmation.

1- Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) ou test au Rose Bengale (RB) :

a- Principe :

Cette épreuve est une simple agglutination rapide utilisant un Ag coloré au Rose Bengale et tamponné à un pH bas, habituellement de 3.65 +/- 0.05. Cette agglutination se fait par interaction avec les Ac sériques, c'est une **épreuve qualitative** qui permet de révéler les IgG1 et les IgM et également les IgG2.

Le test au RB se fait en mélangeant une goutte d'Ag à une goutte de sérum afin d'observer la réaction d'agglutination. Le transport de cet Ag peut poser des problèmes car il se détruit assez rapidement à la température ambiante. Le test est aussi affecté par la température à laquelle il est pratiqué. Pour toutes ces raisons on obtient des résultats plus précis et plus facilement reproductibles si on l'utilise au laboratoire que sur le terrain. En outre, au laboratoire il est possible de respecter certaines normes pour l'interprétation des résultats.

b- Matériel :

- Plaques en verre à surface plane
- Micropipettes distributrices de sérum
- Embouts en plastique à usage unique.
- Compte gouttes pour la distribution de l'Ag
- Mélangeurs (baguettes en verre ou en plastique)
- Agitateur
- Chronomètre ou minuterie

c- Réactifs :

- Antigène Bengate^R (synbiotics)
- Eau physiologique
- Sérum à tester
- Sérums témoins positif et négatif

d-Téchnique de réalisation :(voir annexe)

2- La réaction de Fixation du Complément (FC) :

a- Principe :

Le complément se compose d'une série de constituants protéiques qui réagissent d'une façon séquentielle, à partir de l'activation d'un premier fragment par un complexe Ag-Ac.

Dans la réaction de FC, appliquée à la brucellose, on procède à deux étapes :

Première étape : mélange de l'ensemble Ag brucellique et sérum à tester (complexe Ag-Ac) avec du sérum normal du cobaye (Complément).

Deuxième étape : introduction d'un système indicateur ou « système hémolytique » qui consiste à ajouter une suspension d'hématies du mouton préalablement sensibilisées, c'est-à-dire, recouvertes d'Ac anti-mouton. Si le sérum à examiner contient des Ac brucelliques, le complément est entièrement fixé dans la première étape de sorte qu'il ne peut réagir au cours de la deuxième étape ou il n'y aura pas d'hémolyse. Au contraire, si le sérum à examiner ne contient pas des Ac brucelliques, on constatera une hémolyse au cours de la deuxième étape, qui indique que le complément n'a pas été fixé pendant la première étape.

b-Matériel :

- Plaques de microtitration à fond en U.
- Comtes-goutes de 25µl et 50µl.
- Tubes à hémolyse.

- Pipettes graduées à 2 traits (au 1/100) de 0.5ml, 1ml et 2ml.
- Pipettes graduées à 2 traits (au 1/10) de 5ml et 10ml.
- Bain-marie à 37°C et 60°C.
- Etuve à 37°C.
- Réfrigérateur à +4°C.
- Centrifugeuse réfrigérée pour plaques de microtitration.

c- Réactifs :

- Antigène pour fixation de complément brucellose.
- Sérums à examiner.
- Sérum(s) témoin(s) positif(s) de titre connu.
- Sérums(s) témoin(s) négatif(s).
- Complément lyophilisé.
- Hématies de mouton.
- Sérum hémolytique.
- Tampon Véronal Calcium Magnésium (T.V.)

d- Technique de réalisation : (voir annexe)

III- Résultats :

Au total nous avons réalisé 21 prélèvements, dont 12 (57.14%) pour motif de RP et 9 (42.85%) pour motif d'avortement, ces résultats sont représentés sous forme d'un tableau N° VI.

Tableau VI: Nombre et taux d'avortements et de RP constatés sur l'ensemble des cas suspects.

Signes cliniques	Nombre de cas constatés	Taux
Avortement	09	42.85%
RP	12	57.14%
Total	21	100%

Les données du tableau VI sont représentées sous forme d'un diagramme en fromage (Figure 17).

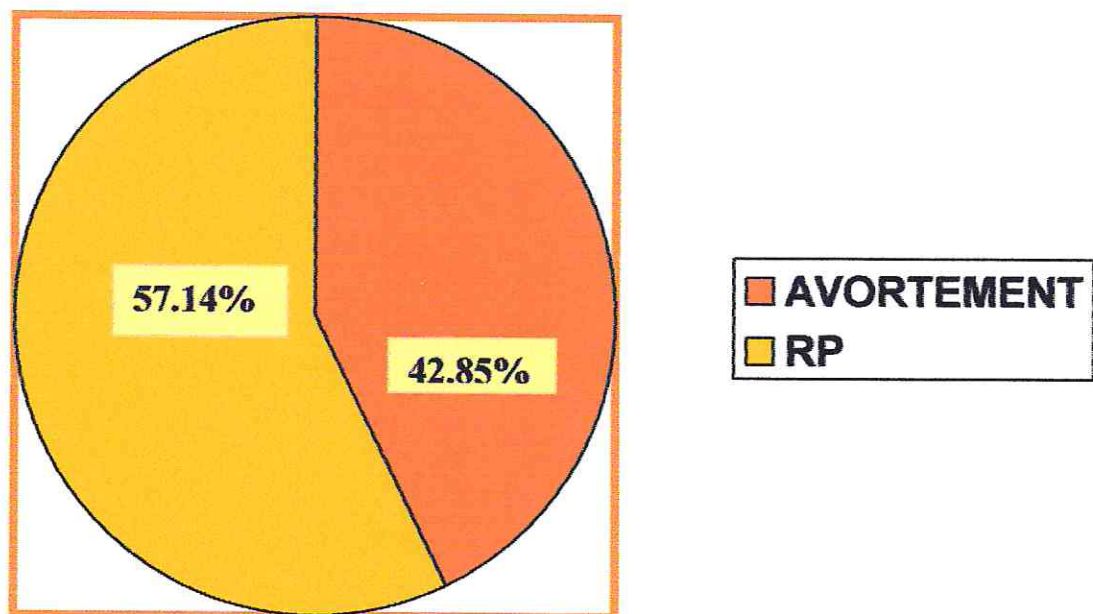


Figure 17 : Taux d'avortements et de RP constatés sur l'ensemble des cas cliniques suspects.

Sur un ensemble de 21 prélèvements suspects de brucellose, 5 se sont avérés positifs à la sérologie, un nombre correspondant à un taux de 23.80%, ces résultats sont regroupés dans le tableau VII.

Tableau VII : Nombre et taux des cas positifs et des cas négatifs à la sérologie, constatés sur l'ensemble des prélèvements effectués.

	Sérologie positive	Sérologie négative	Total
Nombre	5	16	21
Taux	23.80%	76.2%	100%

Ces résultats sont représentés sous forme de diagramme en fromage (figure 18)

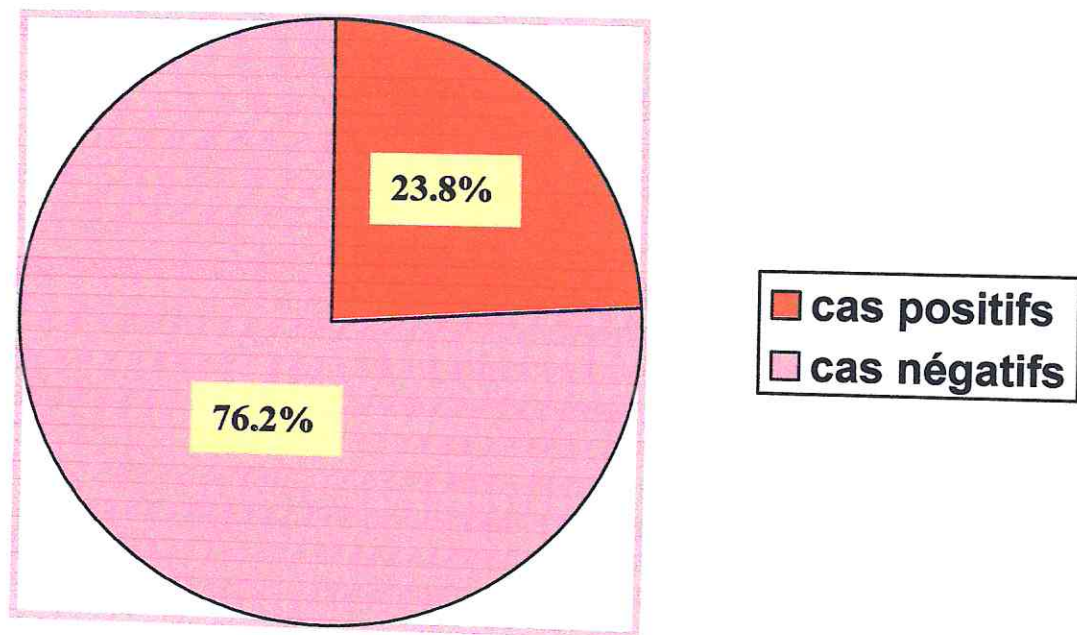


Figure 18 : Diagramme illustrant le taux de cas positifs et des cas négatifs à la sérologie.

En résumé, sur un ensemble de 21 cas suspects de brucellose, nous avons 9 avortements dont 3 sont positifs à la sérologie, ce chiffre correspondant à un taux de 33.33% des avortements. Et 12 RP parmi lesquelles seulement 2 sont sérologie positive ce qui représente 16.66% de l'ensemble des RP, ces résultats sont représentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Nombre de cas positifs et négatifs relatifs à chacun des deux signes cliniques.

Signes cliniques	Sérologie positive		Sérologie négative	
	Nombre	Taux	Nombre	Taux
Avortement	3	14.28%	6	28,57%
RP	2	9.52%	10	47,62%
Total	5	23.8%	16	76,19%

Les données du tableau VIII sont représentées sous forme d'un histogramme (figure 19)

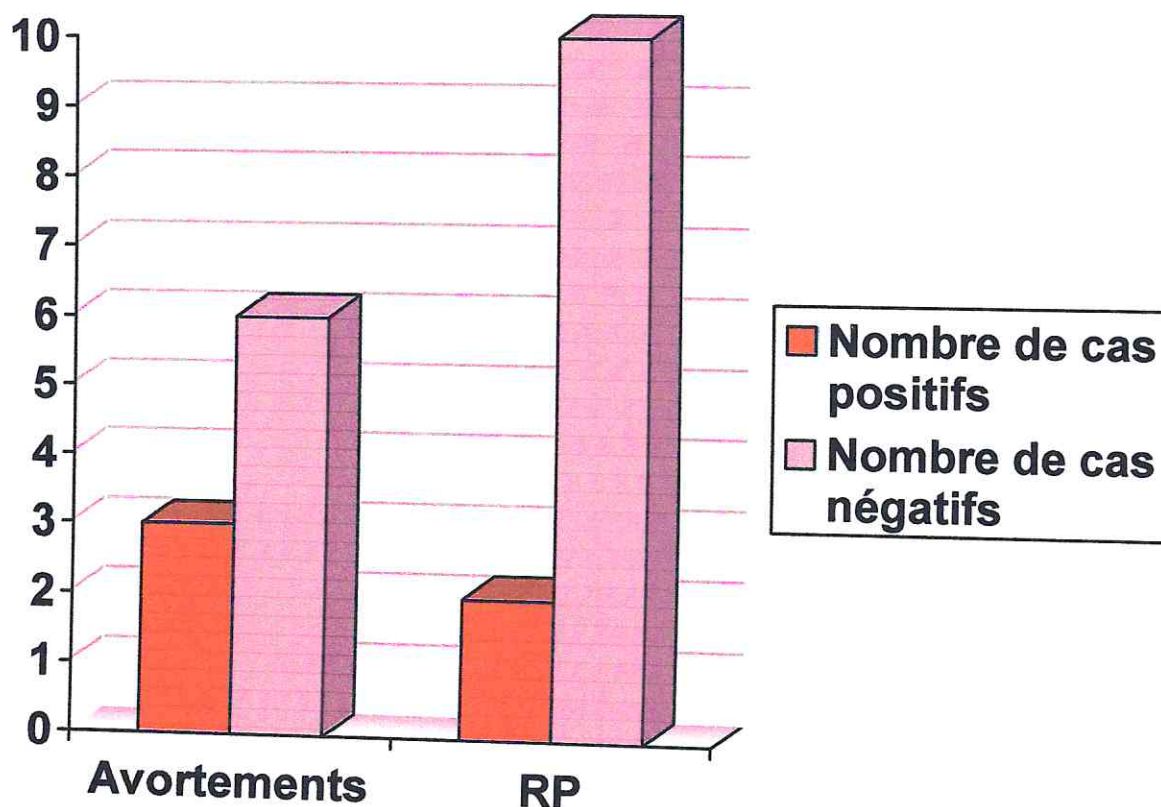


Figure 19 : Nombre et taux de cas positifs par rapport aux cas négatifs relatifs à chacun des deux signes de suspicion de la brucellose.

Le taux de positivité relatif aux 9 cas d'avortement suspects et de 33.33%, à savoir 3 cas positifs. Le taux de positivité relatif aux RP est de 16.66% (2 cas positifs sur 12 cas suspects).

Tableau IX : Taux de positivité relatif à chacun des deux signes cliniques.

Signes cliniques	Nombre de cas constatés	Nombre de cas positifs à la sérologie	Taux de la sérologie positive
Avortement	9	3	33.33%
RP	12	2	16.66%

Les données de ce tableau sont représentées sous forme d'un histogramme (figure 20).

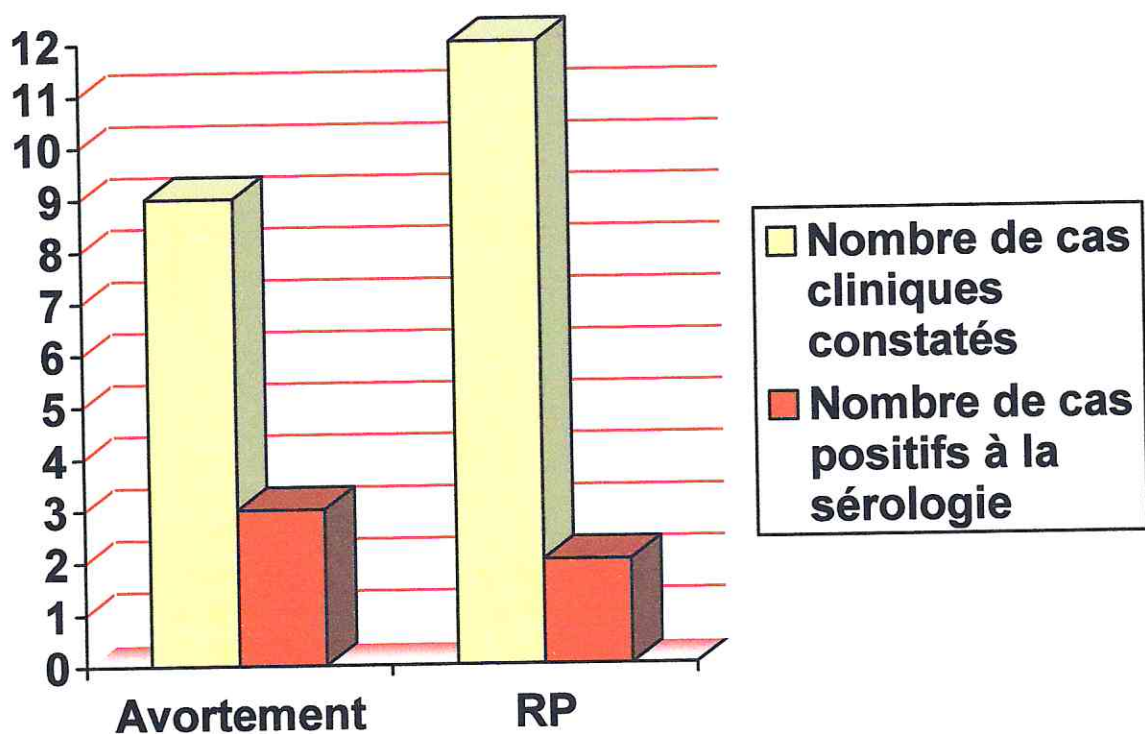


Figure 20 : Nombre de cas positifs à la sérologie par rapport aux nombre des cas cliniques constatés.

Sur nos 5 cas positifs à la sérologie, 60% ce sont manifestés par des avortements et 40% restantes par des RP.

Tableau X : Taux des avortements et des RP positives à la sérologie.

	Avortement	RP	Total
Nombre	3	2	5
Taux	60%	40%	100%

Les données du tableau X sont illustrées sous forme d'un diagramme en fromage (figure 21).

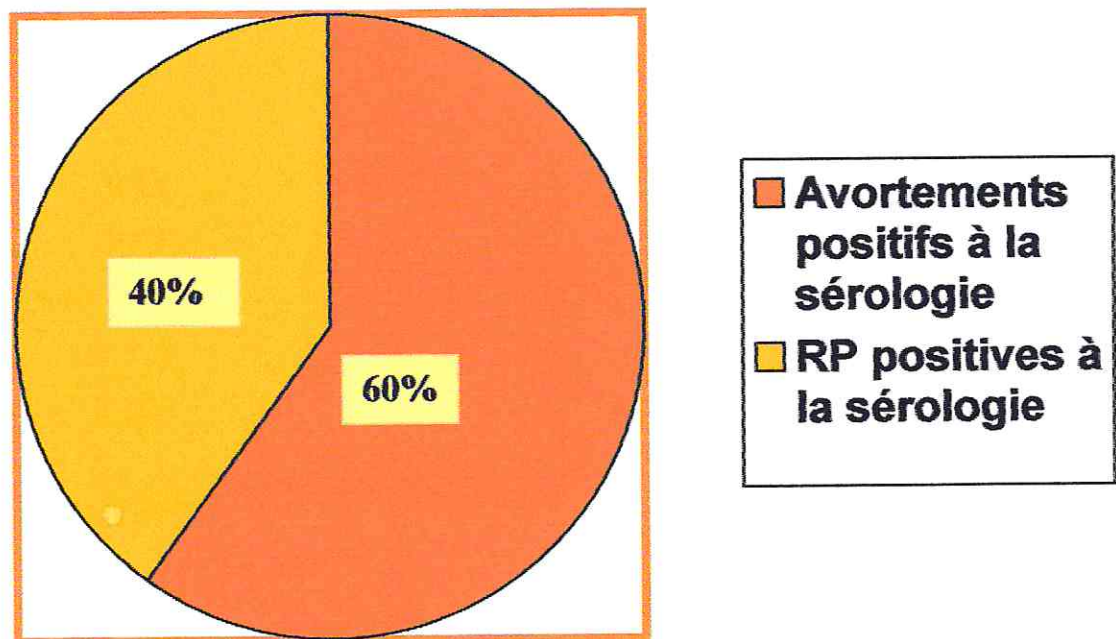


Figure 21 : Taux des avortements et des RP sérologie positive.

IV-DISCUSSION :

On a remarqué que les taux des effectifs dépistés dans les deux Daïras : M'chedalah (Bouïra) et Tazmalt (Béjaïa) ne dépassent jamais les 50% ; et d'après les DSV de ces deux Daïras, ces taux sont estimés à 24,93% pour la Daïra de M'chedalah et 30,76% pour celle de Tazmalt pour l'année 2007. Cela est dû à plusieurs contraintes rencontrées par les vétérinaires étatiques comme l'éloignement des foyers de bovins, zones inaccessibles, manque de moyens de transport et de tout cela découle l'existence des animaux qui, malgré répertoriés, ne subissent qu'un seul dépistage dans leur vie, chose qui les classe dans la même catégorie que les animaux non répertoriés. A ne pas oublier la négligence des propriétaires à appeler le vétérinaire pour faire le dépistage, en voyant que cela est inutile quand ils n'ont pas de grand effectif.

A l'échelle nationale, durant ces dix dernières années, 79% des bovins positifs ont été abattus, les 21% des animaux positifs restants ont échappé à l'abattage et constituent donc une véritable source pour la propagation de la maladie ce qui est rapporté par LOUNES. N [74]. Le faible nombre d'animaux dépistés et le nombre important d'animaux positifs qui échappe à l'abattage pourrait expliquer la non amélioration de la prévalence après tant d'années de luttés, que ce soit au niveau régional ou national.

Nous avons aussi remarqué au cours de notre étude chez un vétérinaire privé dans ces mêmes régions, une fréquence relativement élevée des avortements et des rétentions placentaires bovines. Et quand le vétérinaire est appelé pour motif d'avortement ou de rétentions placentaires, même suspectant la brucellose, il se contente de délivrer la vache, sans jamais penser à effectuer un prélèvement pour le laboratoire.

Nous avons pris en considération le faible taux du dépistage de la brucellose bovine dans ces deux Daïras, la fréquence élevée des avortements et des rétentions placentaires et la conduite à tenir de la plupart des vétérinaires devant un avortement qui est selon HANZEN. Ch [40] inévitable dans 80% des cas brucelliques, et nous avons réalisé des prélèvements sur des vaches qui ont présenté des avortements suivis de rétentions placentaires ou des rétentions placentaires seules, pour le diagnostic sérologique de la brucellose et tout cela dans le but de corréler ces deux symptômes à la pathologie.

Sur un total de 21 prélèvements réalisés sur 9 vaches avortantes et 12 vaches ayant présenté des rétentions placentaires, nous avons trouvé 5 cas positifs à la brucellose, un taux correspondant à 23.80% de l'ensemble des prélèvements, dont 3 sont des avortements ce qui

représente 14,28% du total prélevé et 33,33% des avortements. Sur les 12 cas de rétentions placentaires, 2 cas se sont avérés positifs à la sérologie, c'est 16,66% des rétentions placentaires, un taux très significatif, représentant 9,52% du cumulé des prélèvements.

Les données des DSV des deux Daïras démontrent que l'effectif total des vaches de la Daïra de M'chedalah est estimé à 802 dont à peu près 200 sont dépistées et que seulement une vache s'est avérée positive à la brucellose, c'est le même chiffre de positivité constaté dans la Daïra de Tazmalt sur un effectif total de 858 vaches dont 264 sont dépistées.

Nos résultats sont en analogie avec ceux trouvés par la plupart des auteurs qui se sont intéressés à la corrélation des avortements et RP avec la sérologie positive de la brucellose. Nous avons trouvé que 60% de nos cas positifs se sont manifestés par des avortements, un taux se rapprochant de celui cité par HANZEN. Ch [40] : « 80% des vaches brucelliques avortent » et « l'avortement en est le signe clinique habituel ». BERTRANIDA & al [32] dans « Utilisation chez l'homme d'un Ag phénatosoluble brucellien comme test de la détection de la sensibilité cutanée spécifique » citent que « dans un élevage bovins infecté (par la brucellose), le nombre d'avortement est très élevé au début et peut intéresser la première année, 40-80% des vaches ». LOUNES. N [74], a constaté lors de son étude sur la prévalence de la brucellose bovine dans la région du centre (Algérie) que chez les femelles, les avortements sont fréquemment observés, tout au long de l'année, sous forme sporadique, en milieu et en fin de gestation. La brucellose semble être la première cause des avortements, responsable du quart ou de la moitié de ces derniers chez les bovins.

Nos résultats démontrent, comme ils l'ont fait GRUNERT. E [33] et LACHATRE. S [76] que la RP fait souvent suite à une infection génitale plus au moins étendue, spécifique ou non à la brucellose.

Du total des RP que nous avons constaté, 16,66% se sont révélées positives à la brucellose, à savoir 2 cas de RP positives sur 12 RP suspects, un taux significatif qui nous incite à ne pas négliger la présence des RP dans des troupeaux non indemnes de la brucellose, chose qui a été rapportée par ARTHUR GH [72].

Cependant, nos résultats sont en incompatibilité avec les statistiques des DSV des deux Daïras, à dire que les chiffres rapportés sont vrais mais les résultats ne sont pas fiables à 100% car la méthode du dépistage et les erreurs de manipulation au niveau du laboratoire poussent à douter des résultats, par exemple :

- conservation des prélèvements avant l'acheminement au laboratoire de durée de plus de trois jours.

- Mal disposition des tubes des prélèvements sanguins conduisant à l'hémolyse.
- Au niveau du laboratoire, on peut avoir une rupture de la chaîne du froid pour les Ag utilisés (il faut les sortir du réfrigérateur 30min avant utilisation pour avoir la même température avec le sérum à tester, et les remettre au réfrigérateur).

Les éleveurs sont considérés comme un obstacle très important par leur négligence qui est due soit à un manque, voire absence de l'éducation sanitaire, soit à l'indemnisation très faible de la valeur réelle de l'animal, cela pousse les éleveurs à éviter de faire le dépistage, ce qui favorise une contamination et une propagation de la brucellose bovine et même aux autres espèces y compris l'homme chez qui elle constitue une zoonose majeure.

Les vétérinaires ont leur part de responsabilité quant à la situation inquiétante de la brucellose en Algérie. En effet, la plupart d'entre eux, devant un avortement, ne font pas appel au laboratoire afin de connaître la cause réelle de l'avortement même s'ils pensent que la brucellose pourrait être la première cause.

Pour la RP, les vétérinaires interrogés les associent peu à cette pathologie, d'après N LOUNES ce qui laisse, encore une fois, la brucellose passer inaperçue avec ce symptôme, pour persister dans nos élevages.

CONCLUSION :

Notre étude nous a permis de déduire que la brucellose bovine sévit avec une fréquence assez significative, dans les deux Dairas : M'chedalah et Tazmalt (5 cas sérologiquement positifs parmi 21 cas suspect durant la période de Juin 2007 à Mai 2008).

La situation de la brucellose bovine n'a pas connu d'amélioration réelle à cause de la défaillance des programmes de lutte, comme le faible dépistage et le nombre important d'animaux atteints non abattus.

Le vétérinaire et l'éleveur contribuent chacun de sa part à cette défaillance, le premier par sa négligence devant un avortement ou encore plus une rétention placentaire, il ne fait presque jamais appel au laboratoire pour confirmer sa suspicion. Le deuxième, par son manque d'expérience, il ne prête attention à ces deux symptômes qu'en cas de complications.

Les résultats de notre étude confirment que les avortements et les rétentions placentaires chez les vaches ne sont pas tous dus à la brucellose.

Une étude plus approfondie sur ce sujet serait souhaitable à l'avenir.

ANNEXES

ANNEXE N° 1

Tableau A : tableau résumant les renseignements concernant les prélèvements, les vaches suspectes et les résultats du laboratoire.

Date du prélèvement	ID vache ou nom propriétaire	Race	Ordre dernière portée	Nombre vêlages	N° d'avortements sans dernier	N° RP sans la dernière	Autres informations	Résultats
16/06/2007	10370556	Population moderne	2	2	0	0	RP lors du dernier vêlage	(-)
20/06/2007	10370332	Population moderne	3	3	3	1	Deux RP successives et le premier part normal	(-)
24/06/2007	063704159	Population moderne	2	2	0	0	Mortalité néonatale	(+)
30/06/2007	10370006	Population moderne	7	6	0	0	Avortement de la dernière portée suivi d'une RP	(-)
02/07/2007	44853	Population moderne	1	1	0	0	Vêlage normal suivi d'une rétention placentaire	(-)
07/07/2007	BENALI Daoud	Population moderne	2	1	0	0	Avortement de la dernière portée suivi d'une RP	(-)
09/07/2007	064805802001	Population moderne	3	2	0	0	Avortement au 7 ^{ème} mois	(-)
17/07/2007	DJELOUDI Nacer	Population locale.	2	1	0	0	Mort fœtale à 2 ^{ème} portée au 8 ^{ème} mois	(-)
23/07/2007	58060	Population locale	4	3	0	1	Avortement de la dernière portée suivi d'une RP	(-)
03/08/2007	MERZOUK Khedoudja	Population moderne	6	6	0	0	RP lors du dernier vêlage	(-)
07/08/2007	103703118	Population moderne	2	2	1	1	RP lors de la dernière mise bas	(+)
13 /08/2007	103703127	Population moderne	3	3	0	0	RP lors du dernier vêlage	(-)
03/09/2007	0276	Population moderne	3	3	0	2	RP lors de la dernière mise bas	(+)
24/09/2007	103702113	Population moderne	3	2	0	0	Avortement lors du dernier vêlage suivi d'une RP	(+)
09/10/2007	0707	Population locale	1	1	0	0	RP	(-)

18/11/2007	0419	Population locale	2	2	0	0	RP lors du dernier vêlage	(-)
24/12/2007	10370470	Population moderne	4	3	0	0	Avortement lors du dernier vêlage suivi d'une RP	(+)
03/02/2008	10370675	Population moderne	1	1	0	0	RP	(-)
19/02/2008	103702140	Population moderne	4	4	Antécédents inconnus	Antécédents inconnus	RP lors du dernier vêlage	(-)
09/04/2008	10370580	Population moderne	2	2	Antécédents inconnus	Antécédents inconnus	RP lors du dernier vêlage	(-)
22/04/2008	103703127	Population moderne	3	2	Antécédents inconnus	Antécédents inconnus	Avortement au 8 ^{ème} mois	(-)

Fiche de renseignements : (dépistage de la brucellose)

Nature du troupeau : laitier à viande

Type d'élevage : en stabulation libre

Race de la vache :

ID de la vache ou nom du propriétaire

Région :

-
- Ordre de la dernière portée
 - Nombre de vêlages
 - Nombre d'avortements sans compter le dernier
 - Nombre de RP sans compter le dernier
 - autres informations :

Nature du prélèvement :

Date du prélèvement :

Résultats du laboratoire : positif négatif

Prélèvements réalisés par :

- **MOHAMMEDI Souria**
- **BENHAMOUCHE Aini**

Le vétérinaire chargé de l'envoi des prélèvements :

Le vétérinaire :

ANNEXE N° 3

Technique de la réalisation de la fixation du complément :

1. Titrage du complément :

Effectuer en tubes comme pour la méthode de fixation du complément en tube soit :

- Reprendre le complément lyophilisé par la quantité de solvant indiquée.
- Faire une dilution à 1/100 en tampon véronal (0.1 ml dans 9.9 ml de T.V).
- Répartir en tube selon le schéma suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Témoins hémolyse	
C à 1/100(ml)	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14	0.15	0.16	0	0.40
Tampon véronal (ml)	0.36	0.35	0.34	0.33	0.32	0.31	0.30	0.29	0.28	0.27	0.26	0.25	0.24	0.40	0
Antigène dilué selon titre(1unité) (ml)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	Agiter les tubes- les placer au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes														
Couple hémolytique (ml)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
	Agiter les tubes, les placer au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes														

- Préparer les éléments du couple hémolytique (suspension de globules rouges et solution de sérum hémolytiques) en quantité suffisante pour le titrage du complément et les examens.

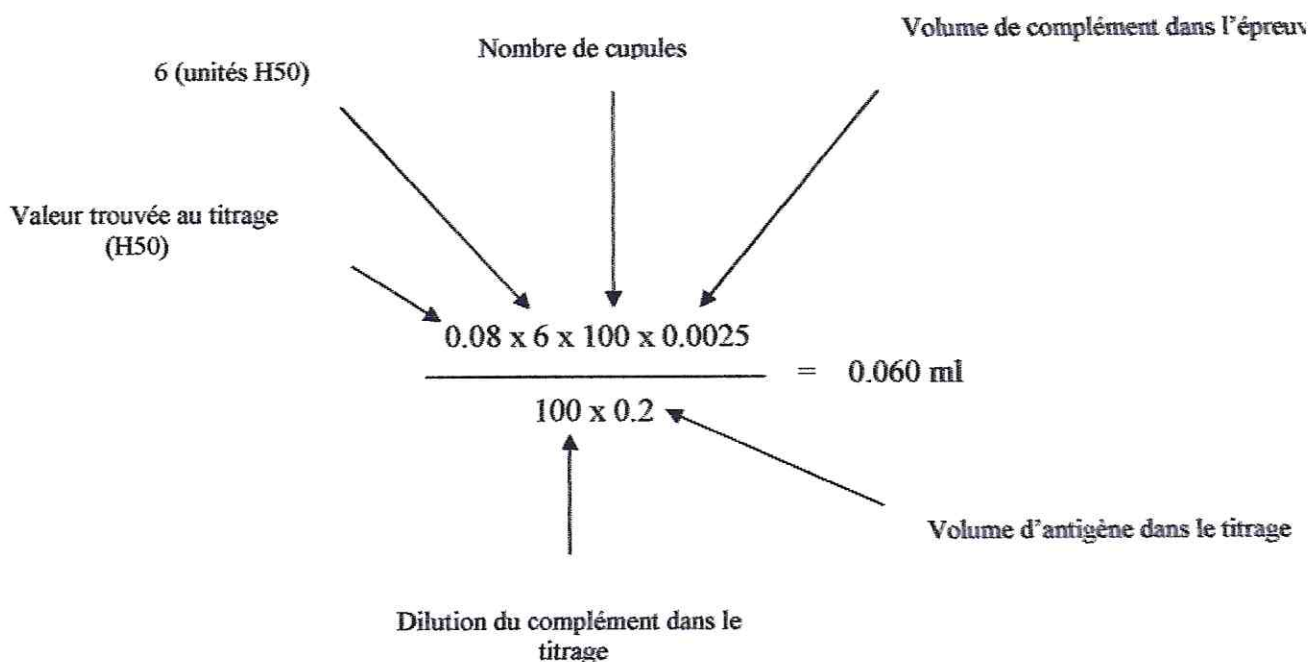
Couple hémolytique : mélange à partie égale de :

- Suspension d'hématies à 2.5 % soit 0.5 ml d'hématies (déjà dilué à 50%) plus 9.5 ml de tampon véronal ;
 - Sérum hémolytique dilué selon titrage ;
 - Mélanger 20 minutes avant l'emploi des quantités nécessaires pour le titrage du complément et laisser à la température du laboratoire (garder à +4°C jusqu'au lendemain et séparément le reste des éléments du couple).
- Centrifuger immédiatement les tubes à la sortie du bain marie pendant 10 minutes à 500-100g. Faire un témoin hémolyse H₅₀ (0.50 ml du surnageant du témoin hémolyse H₀ et 0.50 ml du surnageant du témoin hémolyse H₁₀₀).
- Prendre comme unité H₅₀ le premier tube de la gamme dont le surnageant présente la même coloration que le témoin H₅₀ ainsi préparé.

Calcul de la quantité de complément à préparer pour les examens :

Exemple :

- Nombre de cupules = 100, chaque cupule reçoit 0.025 ml de complément dilué soit :
0.025 ml x 100 = 2.5 ml (volume total de complément dilué)



L'unité H_{50} a été trouvée pour le tube n° 5 (0.08 ml de complément à 1/100).

L'épreuve utilise 6 unités H_{50} soit :

- Soit 0.060 ml de complément pour 2.44 ml de tampon véronal.

Epreuve :

-Inactiver les sérums par chauffage au bain-marie à 60°C pendant 30 minutes.

-Diluer les sérums à examiner et les sérums témoins à 1/4 en tube ou en plaque et effectuer les dilutions suivantes sur plaque microtitration :

	Cupules	Tampon (μ l)	Sérum dilué à 1/4 (μ l)	Dilutions	Dilutions finales	Volume final (μ l)	
Témoins	A	-	25	-	1/4	25	
sérums	B	-	25	-	1/4	25	
	C	25	25	← 25	1/8	25	
	D	25	-	← 25	1/16	25	
	E	25	-	← 25	1/32	25	
	F	25	-	-	1/64	25	
	G	← 25					
	H	← 25					

-Ajouter ensuite les différents réactifs selon le schéma suivant :

		Cupules		
		Antigène dilué selon titre (1unité) (µl)	Tampon (µl)	Complément (µl)
Témoins sérum	A	-	25	25
	B	25	-	25
	C	25	-	25
	D	25	-	25
	E	25	-	25
	F	25	-	25

- Chaque cellule d'examen comportera les témoins suivants :

		Cupules	Sérum dilué (µl)	Antigène dilué (1unité)(µl)	Tampon(µl)	Complément (µl)
Témoins antigène	{	1	-	25	25	25
		2	-	25	25	25
Témoins Complément	{	3	-	-	50	25
		4	-	-	50	25
Témoin Couple hémolytique	{	5	-	-	75	-
		6	-	-	75	-

- Agiter les plaques à couvrir.
- Placer les plaques au réfrigérateur à +4°C pendant une nuit.

Le lendemain :

- Préparer le couple hémolytique (mélange à volumes égaux de la suspension de globules rouges et de solution de sérum hémolytique préparé la veille).
 - Laisser le mélange 10 minutes à la température du laboratoire.
 - Placer alors les plaques 10 minutes à l'étuve à 37°C.
- Le couple hémolytique a été maintenu ainsi 20 minutes à température du laboratoire.
- Ajouter dans toutes les cupules 50µl de couple hémolytique.

- Agiter les plaques puis les couvrir.
- Placer les plaques à l'étuve à 37°C pendant 30 minutes.

Lecture :

- Centrifuger les plaques pendant 10 minutes à 500-1000g (centrifuge réfrigérée) ou les laisser 1 heure au réfrigérateur à 4°C.
- Le degré d'hémolyse des hématies sensibilisées dans chaque cupule est noté de la façon suivante :
 - ++++ = inhibition complète de l'hémolyse.
 - +++ = 75% d'inhibition de l'hémolyse (= 25% d'hémolyse).
 - ++ = 50% d'inhibition de l'hémolyse (= 50% d'hémolyse).
 - + = 25% d'inhibition de l'hémolyse (= 75% d'hémolyse).
 - 0 = hémolyse complète.

Interprétation :

-Moins de 50% d'inhibition de l'hémolyse à la dilution 1/4 = NEGATIF.
 -50% (++) ou plus d'inhibition de l'hémolyse à la dilution 1/4 = POSITIF.

Tableau de correspondance entre dilution du sérum et du nombre d'unités CCE sensibilisatrices (limite : 50 pour 100 d'inhibition) :

Dilution du sérum	1/2	1/4	1/6	1/8	1/16
1/32					
Nombre d'unités		20	30	40	80
CEE	10				
160					
Sensibilisatrices					

Seuil de positivité

ANNEXE N° 4

Technique de réalisation de test au Rose Bengale :

Mode opératoire :

- 1- Amener les échantillons de sérum et l'antigène à la température ambiante de laboratoire. Il convient de ne retirer du réfrigérateur que la quantité d'Ag nécessaire à l'exécution des tests prévus pour la journée.
- 2- Déposer successivement aux endroits prévus à cet effet sur plaques destinées au test, une goutte de chacun des échantillons de sérum à contrôler. Le volume de la goutte déposée est de 30 microlitre pour les plaques de verre à surface plane et de 25 microlitre pour les plaques HA.
- 3- Lorsque tous les échantillons des sérums ont été déposés sur une plaque ou que celle-ci est plane, mettre une goutte d'Ag sur chaque échantillon de sérum. Le volume de la goutte déposé est de 30 microlitre pour les plaques de verre à surface plane et de 25 microlitre pour les plaques HA.
- 4- Dès que la dernière goutte a été déposée sur la plaque, mélanger minutieusement les sérum et l'Ag. Cette opération effectuée avec un mélangeur (cure-dent) pour les plaques à surface plane. Par contre pour les plaques HA, il convient de procéder des la façon suivante: placer la plaque, toujours protégée par son morceau de tissu, à plat sur la pailasse et la saisir fermement des deux mains. Ensuite, lui imprimer un mouvement giratoire décidé, six fois dans le sens des aiguilles d'une montre et six fois en sens inverse. Après cette opération, le mélange sérum-Ag devrait se séparer dans chaque cupule sur toute la surface du fond.
- 5- Dès que le mélange sérum-Ag a été réalisé, placer les plaques sur agitateur à mouvement de va et vient pour les plaques à surface plane ou à mouvement giratoire pour les plaques HA, puis mettre la machine en marche pendant exactement quatre minutes.
- 6- Lire les résultats dès la fin de la période d'agitation de quatre minutes. Avec des plaques à surfaces planes, on pourra considérer le résultat comme positifs en présence

d'une agglutination quelque soit, ou au contraire négatif en l'absence de toute agglutination. Avec des plaques HA, il sera possible d'effectuer une évaluation plus approfondie en se fondant sur les critères suivants, chiffrés de 0 à 3 croix (3+):

0 = absence d'agglutination, pas d'anneau bordant la cupule, mélange de couleur rose uniforme.

1 = agglutination à peine perceptible et /ou apparition d'une trace d'anneau bordant la cupule.

2 = apparition d'une fine agglutination et d'un anneau nettement formé; léger éclaircissement de mélange.

3 = agglutination massive et net éclaircissement du mélange.

Ce n'est que par l'observation de nombreux sérums connus présentant une réaction négative, et de quelques autres présentant une réaction faiblement positive, que l'on apprendra à reconnaître les anneaux ayant une valeur significative pour ce test.

Interprétation des résultats (test sur plaques HA):

L'interprétation des résultats dépend de l'objectif poursuivi. En effet, ce test peut être utilisé comme épreuve de dépistage systématique (chez les bovins), de contrôle final (chez les porcins) ou de diagnostic de présomption (chez d'autres espèces).

Epreuve de dépistage systématique. On doit considérer tout degré de positivité, c'est-à-dire toute réaction allant de 1+ à 3+ comme un élément de suspicion, nécessitent un nouveau contrôle de l'échantillon de sérum qui sera soumis à l'épreuve de fixation de complément (FC) à titre de test définitif.

Epreuve de contrôle final. La présence d'une nette agglutination indique que la réaction est positive. Lorsque l'on constate sur les plaques HA une réaction à 1+ résultant de la présence d'une trace d'anneau sans agglutination visible, il convient de considérer le résultat comme douteux.



La photo ci-dessus montre à droite un sérum négatif (pas agglutination) et à gauche un sérum positif (agglutination) [10]

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- [1] : **LEON MICHEL & al., 1989** : Bactériologie médicale, 2nd ed, Médecine Sciences Flammarion, p 651-666.
- [2] : **BOUYOUCHEF. A., 2006-2007** : La brucellose. Polycopié de cours de microbiologie spéciale (3 année vétérinaire), université SAAD DAHLEB, BLIDA.
- [3] : **PIERRE CHARLES LEFEVRE., JEAN BLANCOU & PENE CHEMETTE., 2003**: Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires, tome 2, ed Tec & Doc, p 869-881.
- [4] : **AVRIL. J.L & al., 2000** : Bactériologie clinique, 3rd ed, ellipses, p 341-349.
- [5] : **DOMINIQUE SOLTNER., 2001** : La reproduction des animaux d'élevage, 3^{ème} ed, collection sciences et techniques agricoles, p 47, 52, 53.
- [6] : **DERIVAUX & ECTOR.F., 1980** : Physiopathologie de gestation et obstétrique vétérinaire, les éditions du point vétérinaire, 12 rue de Marseille 94700, Maisons Alfort, p 44, 50, 51, 247,248.
- [7] : **FLORENCE BATTELIER & al., 2005** : Reproduction des animaux d'élevage, 2^{ème} ed , educagri, p 108.
- [8] : **Embryologie Comparée des Animaux, chapitre VI, Membranes extra embryonnaires, implantation et placentation, 2008**
http://didactique.sc.ucl.ac.be/ABCV/VETE1250/Embryologie_introgenerale.htm
- [9] : **Les zoonoses infectieuses**, chaire des maladies infectieuses, polycopie de cours des maladies infectieuses des 4 écoles françaises, p 20.
- [10] : **PHILIPPON.A., 2003** : Cours de microbiologie (Faculté de Médecine COCHIN-PORT-ROYAL, Université PARIS, [http:// www.Microbs.edu.org](http://www.Microbs.edu.org).
- [11] : **GILBERT BONNES. , JEANINE DESCRAUD & al., 1988** : Reproduction des mammifères d'élevage, enseignement agricole/formation professionnelle. Les éditions Foucher / collection INRAP, p88.
- [12] : **PILIC & al., 1979** : Bactériologie médicale et vétérinaire. Biologie appliquée, collection publiée sous la direction de a-obré et r-butiaux. 2nd ed, p 203-212.
- [13] : **ERVE CLIMENT., 1992** : Contribution à l'étude de vêlage d'après une enquête du centre d'écopathologie animale, « les conditions de vêlage : facteurs de risque pour la fertilité des vaches allaitantes ». Thèse pour le doctorat vétérinaire, (école nationale vétérinaire d'Alfort), p 17.
- [14]: **BLOOD & HENDERSON., 1976**: Médecine vétérinaire, 2^{ème} ed d'après la 4^{ème} ed Anglaise, BAILLIERE, TINDALL & CASSELL LTD, LONDON, p 426,427.

[15]: ALTON G.G & al., 1988: Technics for the brucellosis laboratory, 1st ed INRA, Paris, p 63, 85, 132.

[16]: ALTON.G.G. & al., 1992 : Diagnostic bactériologique vétérinaire : méthodes de laboratoire pour le diagnostic de certaines maladies du bétail, organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, étude FAO production et santé animale 81, p 1-50.

α [17]: MENOUEI. N., 2006-2007 : La brucellose, Polycopie de cours de maladies infectieuses I. Université SAAD DAHLEB, BLIDA. (4 année vétérinaires),

[18]: MICHEL THILLEROR., 1980 : Hygiène vétérinaire, collection d'enseignement agricole, édition J-b baillière, 4th ed ,p 62.

[19]: BAZIN S & al., 1994 : Maladies des bovins : 2^{ème} ed réalisée par l'institut de l'élevage avec le concours de rédaction de la revue de l'éleveur edition France Agricole, Paris. p 242

[20]: GODFROID.J., SAEGERMAN & al., 2002 : How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. Vet. Microbial, 90: p 461- 477.

[21]: NIELSEN.K., 2001: Diagnosis of brucellosis by serology. Vet. Microbial, 90: p 447- 459.

α [22]: Office Internationale des Epizooties (OIE), Manuel terrestre de l'oie 2005, 457 section 2.3. Maladies bovines de liste B. chapitre 2.3.1, Brucellose bovine, [http:// www.oie. int](http://www.oie.int)

[23]: NIELSEN.K., KELLY.L & al., 1996: Comparaison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. Prev. Vet. Med, 26: p 17- 32.

[24]: WRIGHT.P.F., NILSSON.E & al.,1993: Standardisation and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody n infectious disease diagnosis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz, 12: p 435- 450.

[25]: EWALT.R.D., PAYEUR & al., 1997: *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological and histological study. J. Vet. Diagn. Invest, 10: p 417-420

[26]: MORGAN.W.J.B., MACKINNON.D.J & al., 1969: The Rose Bengale plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. Vet. Rec, 85: p 636- 641.

[27]: ANGUS.R.D & BARTON.C.E., 1984: The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. Dev. Biol. Stand, 56: p 349- 356.

[28]: NIELSEN.K., GALD & al., 1996: A homogenous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. J. Immunol. Methods, 195: p 161- 168.

[29]: GARIN.B., TRAP.D & GAUMONT.R., 1985: Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet. Rec, 117: p 444, 445

- [30]: **MAC MILLAN A.P & COCKREN D.S., 1985:** Reduction of non specific reactions of *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of the EDTA. Res. Vet. Sci, 38: p 288- 291.
- [31]: **NIELSEN K., SAMAGH B.S & al., 1979:** The bovine immune response to *brucella abortus*, elimination of the some sporadic serological reactions by chelation of divalent cations. Can. J. Comp. Med, 43: p 420- 425.
- [32]: **BERTRANIDA & al., 1984:** Utilisation chez l'homme d'un Ag phénatosoluble brucellien comme test de la détection de la sensibilité cutanée spécifique. In: international symposium on brucellosis. Develop. Biol. Standard. Vol 56. Karger. Bâle. p 547- 551.
- [33]: **GRUNERT., 1980:** Etiology of bovine retained placenta. In: MOROW. DA. Editor. Current therapy in theriogenology. Philadelphia: WB saunders company. p 180- 186.
- [34]: **NIELSEN K., GALL D & al., 2001:** Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. Vet. Microbiol, 80: p 163- 170.
- [35]: **DIAZ.R., GARATEA & al., 1979:** Radial immunodifusion test with a brucella polysaccharide Ag for differentiating infected from vaccinated cattle. J. Clin. Microbiol, 10: p 37- 41.
- [36]: **LORD.V.R & CHERWONOGRODZKY J.N., 1992:** Evaluation, of polysaccharide, lipopolysaccharide and betaglucan antigens in gel immunodiffusion tests for brucellosis in cattle. Am. J. Vet. Res, 53: p 389- 391.
- [37]: **LORD.V.R & al., 1989:** Evaluation of humoral immunity to *brucella sp*, in cattle by use of an agar-gel immunodiffusion test containing a polysaccharide Ag. Am. J. Vet. Res, 50: p 1813- 1816.
- [38]: **JONES. L.M, BERMAN.D.T & al., 1980:** Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B Ag for diagnosis of bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol, 12: p 753- 760.
- [39]: **JIMENZ DE BOGUES.M.P & al., 1991 :** Effect of antibiotic therapy and strain 19 vaccination on the spread of *brucella melitensis* within an infected dairy herd. Prev. Vet. Med, 11: p 17- 24.
- [40]: **HANZEN. Ch., 2003-2004 :** La rétention placentaire chez la vache, Faculté de médecine vétérinaire. Service d 'Obstétrique et de Pathologie de la reproduction des équidés, ruminants et porcs. Cours de 2ème année doctorat.
- [41]: **European Commission , 11 Octobre 1999:** The modification of technical annexes of council directive 64/432/EEC to take account of scientific development regarding tuberculosis, brucellosis and enzootic bovine leucosis. Report of the scientific committee on an animal health and animal welfare adopted.
- [42]: **Koceir Mohamed & Khelili Ahmed, 2006-2007 :** Contribution à l'étude des retentions placentaires chez la vache laitière, thèse pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire, Université de SAAD DAHLEB, BLIDA, p 42.

- [43] CHASNEAU. N., 1997 : Fréquence des troubles de santé dans les élevages bovins laitiers de la région « Pays de la Loire », thèse de doctorat vétérinaire, ENV, Nantes. 92 p.
- [44] STOCKER .H., WAELCHILIR., 1993: A clinical trial on the effect of prostaglandin F₂alpha on placenta expulsion in dairy cattle after caesarean operation. Vet. Rec, 132: p 507, 508.
- [45]: CHASSAGNE.M & al., 1996 : Epidémiologie descriptive de la rétention placentaire en système intensif laitier en Bretagne. Vet. Res, 27: p 491- 501.
- [46]: ARTHUR GH., NOAKES D.E & al., 2001: Veterinary reproduction and obstetrics, 8th ed. London: WB Saunders Company Ltd, p868.
- [47]: ROBERT.S.J., 1986: Veterinary obstetrics and genital diseases, therogenology 3rd ed. Woodstock: Ithaca. VT. P 335- 342.
- [48]: GRUNERT., 1983: Ätiologie, pathogenese und therapie der Nachgeburtsverhaltung beim Rind. Wien.Tierärstl. Mschr, 70: p 230- 235.
- [49]: ENRIGHT.F.M., 1990: Mechanism of self cure on *Brucella abortus* infected cattle, in: advances in brucellosis research, Adams LG (Ed). Texas A&M University Press, college station (international symposium on advances in brucellosis research, Texas A & M university 1989/ 5/23/26) p 191- 196.
- [50]: NICOLETTI., 1980: The epidemiology of bovine brucellosis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med, 24: p 69- 98.
- [51]: ARENAS.G.N & al., 2000: Intracellular trafficking of *brucella abortus* in J 774 macrophages. Infect. Immune, 68: p 255- 4263.
- [52]: ZHAN & al., 1996: Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intercellular bacterium *brucella abortus* by different mechanisms. Infect. Immune, 64: p 2782- 2786.
- [53]: FAO-OMS., 1986: Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis, 6th report. Organisation mondiale de la santé. Genève (Suisse).
- [54]: KERKHOFS.P.Y., BOTTON.P & al., 1990: Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. Vet, microbial, 24: p 73- 80.
- [55]: GARIN-BASTUJLB., 1993: Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. Le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. Point. Vet, 25 : p 115- 124.
- [56] : BLOOD.D.C., HENDERSON.J.A & RADOSTITS.O.M., 1983: Veterinary medicine, 6th ed, Baillière Tindall, Londres.
- [57]: RILERY.L.K & ROBERTSON.D.C., 1984: Ingestion and intracellular survival of *brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocyte. Infect. Immune, 46: p 224- 230.

[58]: KOHLER.S., LAYSSAC.M & *al.*, 2001: Secretion of listeriolysin by *Brucella suis* inhibits its intramacrophagic replication. *Inf. Immune*, 69: p 2753- 2756.

[59]: CORBEL.M.G., 1985: Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reactions. *Vet. Bull*, 55: p 27- 942.

[60]: SAEGERMAN C., VO T.K & *al.*, 1999: Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Vet. Rec*, 145: p 214- 218.

[61]: WEYNANTS V., TIBOR A & *al.*, 1996: Infection of cattle with *yarsinia enterocolitica* O: 9 a cause of faulse positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic test. *Vet. Microbial*, 48: p 101- 112.

[62]: VALLET A., BADINAND F., 2000: Rétention placentaire, In: institute d'élevage, editor, maladies des bovines, 3ème ed, Paris, édition, France Agricole. p 286- 289.

[63]: LONA D.V & RAMERO R.C., 2001: Short communication: low levele of colostral immunoglobulins in some dairy cows with placental retention. *J. Dairy. Sci*, 84: p 389- 391.

[64]: LORD V.R., SCHURIG V.V & *al.*, 1998: Field study of vaccination of cattle with *brucella abortus* strains RB51 under high and low disease prevalence. *Am. J. vet. Rec*, 59: p 1016- 1020.

[65]: Seddiki Anissa., Bellili Djoucher., 2006-2007 : Contribution à l'étude de la rétention placentaire chez la vache, thèse pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire (école nationale vétérinaire, Algérie), p 20.

[66]: LOSSOI. P., 1981 : Contribution à l'étude de la rétention annexielle chez la vache à travers les résultats de l'enquête écopathologique en continu de l'INRA. Thèse.Med. Vét, Toulouse, 59p.

[67] : BADINAND. F & SENSENBRENNER. A., 1984 : Non délivrance chez la vache, données nouvelles, à propos d'une enquête épidémiologique. *Le point vétérinaire*, p 13-26.

[68] : DERIVAUX J., 1981 : La rétention placentaire et les affections utérines du post partum : In : Constantin A, Meissonnier Editors, l'utérus de la vache , anatomie, physiologie, pathologie. Parie : société française de bruiatrie. P 329- 341.

[69]: DAHOO I.R., MARTIN S.W & *al.*, 1984: Disease, production and culling in Holstien. Friesian cows II. Age, season and sire effects. *Prev. vet. Med*, 2: p 655- 670.

[70]: C.D, 24/08/2007, Une bactérie éclairée. *Science et Avenir*, [http:// www.Nouvelobs.com](http://www.Nouvelobs.com)

[71]: Encyclopédie Wikipedia®, marque déposée de la Wikimedia Foundation, Inc., organisation de bienfaisance régie par le paragraphe 501(c)(3) du code fiscal des États-Unis. La brucellose, <http://www.wikipédia.org>.

[72]: ARTHUR G.H., NOAKES DE & *al.*, 1996: Veterenary reproduction and obstetrics, 7th ed. London: W B Saunders Company Ltd. 726 p.

[73]: **Relevé Epidémiologique Mensuelle (REM)**, vol XV, 2004, Institut National de la Santé Public, <http://www.ands.dz/insp/insp-publicat.htm>.

[74] : **LOUNES. N., 2007** : Séroprévalence de la brucellose animale dans la région centre et impact sur la santé publique, Mémoire de magistère, université de SAAD DAHLEB, BLIDA, p 20, 263.

[75] : Brucellose et voyage. Catalogue Santé et Voyage 2008, Voyages Internationaux Santé Actualités (VISA) Fincogest S.A. Edition, [http:// www. Astrium.com](http://www.Astrium.com).

[76] : **LACHATRE S., 1994** : Le placenta et les annexes fœtales des principales espèces domestiques. Thèse Méd, Toulouse, n°94, 184p.

[77]: **Memish ZA, Balkhy HH**: Brucellosis and international travel. J.Travel Med 2004; 11:49-55.