

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BATNA1 -BATNA-  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES  
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



## THESE

*Pour l'obtention du diplôme de*

**DOCTORAT EN SCIENCES**

*Filière*

*Sciences Vétérinaires*

*Option*

Epidémiologie des maladies infectieuses

*Présentée Par :*

RABEHI Sabrina

## THEME

Les mammites bovines dans la région de Batna :  
Place des brucelles et de *Listeria monocytogenes* en  
santé humaine

### JURY

Président : MELIZI Mohamed  
Rapporteur : HAMDY Taha Mossadak  
Co-Rapporteur : MAMACHE Bakir  
Examineur : EL-GROUD Rachid  
Examineur : BOUDAOUZ Amine  
Examineur : BOUAYAD Leila

### Grade

Prof  
Prof  
Prof  
Prof  
MCA  
MCA

### Université

Univ-Batna-1  
ENSV-Alger  
Univ-Batna-1  
Univ-Constantine  
Univ-Batna-1  
ENSV-Alger

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018/2019

## REMERCIEMENTS

*Je remercie, en premier lieu, le grand Dieu pour m'avoir donné la force, la patience et la résolution pour réaliser ce travail.*

*Un énorme merci à mon directeur de thèse, le Professeur HAMDI Taha Mossadak. Merci pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour tous les précieux conseils qu'il m'a donnés tout au long de cette thèse.*

*Mes vifs remerciements vont à Monsieur le Professeur MAMACHE Bakir qui a accepté de co-diriger ma thèse. Merci à lui pour m'avoir apporté ses connaissances. Merci aussi pour toutes ses aides précieuses.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur MELIZI Mohamed, pour l'effort fourni, les conseils prodigués, leur patience et leur persévérance dans le suivi.*

*Je remercie Mr MELIZI Mohamed Professeur à l'université de BATNA 1 de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de la soutenance de cette thèse.*

*Je remercie Mr EL-GROUD Rachid Professeur à l'université de Constantine de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer au jury de la soutenance de cette thèse.*

*Je remercie Mr BOUDAOU Amine Maître de conférences A à l'université de BATNA 1, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer au jury de la soutenance de cette thèse.*

*Je remercie Mme BOUAYAD Leila Maître de conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer au jury de la soutenance de cette thèse.*



*Je tiens à remercier chaleureusement le directeur du Centre de Recherche en Biotechnologie à Constantine (CRBt) le Professeur AZIOUNE Ammar qui a ouvert les Portes de CRBt pour mes expériences bien que cela ne soit pas une chose habituelle.*

*Je tiens aussi à remercier tout particulièrement et très chaleureusement le chercheur RAHAB Hamza au laboratoire de sérologie et l'ingénieur SELMANIA Abderrahmane au laboratoire de Microbiologie pour leurs aides précieuses.*

*Ma gratitude s'adresse également à l'ensemble du personnel du CRBt pour leur accueil chaleureux ainsi que leur disponibilité et à leur tête Mme Ikhlef Assia chef de service de microbiologie pour son encouragement durant ce travail et Mme Boudchicha Rima Hind chef de service de Biologie Moléculaire, Mlle MEGHEZZI Asma technicienne au laboratoire de Microbiologie pour son aide continue et Mme BOUSHABA Khaoula ingénieur au laboratoire de Biologie Moléculaire au CRBt.*

*Mes vifs remerciements à Monsieur BENLAAMARI Rachid Inspecteur Vétérinaire de Wilaya pour son aide. Merci.*

*Je tiens à remercier aussi les docteurs vétérinaires GUEDJIBA Toufik et BELKACEM Salah pour avoir eu la grande amabilité de se déplacer aux niveau des différentes fermes d'élevage bovin pour réaliser les prélèvements de lait cru et de réaliser le transport des prélèvements au CRBt.*

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES PHOTOS

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION ..... 1

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : RAPPELS SUR LES MAMMITES ..... 5

I. 1. Définition ..... 5

I. 1. 1. Mammmites cliniques..... 5

I. 1. 2. Mammmites sub-cliniques..... 5

I. 2. Etiologie ..... 6

I. 2. 1. Espèces pathogènes majeures ..... 6

I. 2. 2. Espèces pathogènes mineures ..... 6

I. 3. Diagnostic ..... 7

I. 3. 1. Examen clinique..... 7

I. 3. 2. Examen bactériologique ..... 8

A- Prélèvement de lait ..... 8

B- Analyse bactériologique ..... 9

I. 3. 3. Méthodes alternatives..... 10

A- Comptages cellulaires somatiques..... 11

B- Corrélation entre comptages cellulaires et bactériologie..... 14

I. 4. Importance ..... 15

I. 4. 1. Importance économique ..... 15

I. 4. 2. Importance hygiénique (incidence sur la santé humaine) ..... 15

CHAPITRE II : LE LAIT ..... 17

II. 1. Définition..... 17

II. 2. Composition et caractéristiques physicochimiques ..... 17

II. 3. Microorganismes du lait cru ..... 19

II. 3. 1. La flore du lait ..... 19

III. 3. 2. Microorganismes de contamination..... 19

II. 4. Place du lait dans la consommation alimentaire algérienne .....	20
CHAPITRE III : LA BRUCELLOSE, UNE ZONOSE MAJEURE .....	21
III. 1. Historique .....	21
III. 2. Définition et étiologie.....	23
III. 3. Importance .....	24
III. 3. 1. Importance économique .....	24
III. 3. 2. Importance hygiénique.....	25
III. 4. Epidémiologie .....	26
III. 5. Modes de contamination .....	29
III. 6. Pathogénie.....	30
III. 7. Aspects cliniques .....	32
III. 7. 1. Chez l'homme .....	32
III. 7. 2. Chez l'animal.....	33
III. 8. Diagnostic .....	33
III. 8. 1. Diagnostic clinique.....	33
III. 8. 2. Diagnostic bactériologique .....	34
III. 8. 3. Diagnostic sérologique .....	34
III. 8. 4. Diagnostic moléculaire .....	38
III. 9. Lutte contre la brucellose.....	39
CHAPITRE IV : <i>Listeria monocytogenes</i> , AGENT PATHOGENE ZOONOTIQUE .....	41
IV. 1. Historique .....	41
IV. 2. Taxonomie.....	42
IV. 3. Réservoirs de <i>L. monocytogenes</i> .....	42
IV. 4. Définition et étiologie de la listériose .....	43
IV. 5. Caractères bactériologiques .....	44
IV. 5. 1. Caractères morphologiques .....	44
IV. 5. 2. Caractères culturels .....	44
IV. 5. 3. Caractères biochimiques .....	44
IV. 6. Caractères sérologiques .....	45
IV. 7. Caractères génomiques.....	45
IV. 8. Epidémiologie .....	47
IV. 9. Modes de transmission .....	48
IV. 10. Pathogénie .....	49
IV. 11. Facteurs de virulence .....	49

IV. 12. Signes cliniques .....	51
IV. 13. Techniques de recherche de <i>L. monocytogenes</i> .....	52
IV. 13. 1. Méthodes bactériologiques .....	52
IV. 13. 2. Méthodes sérologiques.....	53
IV. 13. 3. Méthodes d'identification par biologie moléculaire .....	54
IV. 14. Lutte contre <i>L. monocytogenes</i> .....	55
IV. 14. 1. Traitement.....	55
IV. 14. 2. Prophylaxie.....	55
a. Prophylaxie dans les élevages .....	55
b. Prophylaxie dans les industries .....	56
c. Prophylaxie chez l'homme.....	57

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

PROBLEMATIQUE .....	58
OBJECTIFS .....	60
I. MATERIELS ET METHODES .....	61
I. 1. Matériels.....	61
I. 1. 1. Echantillonnage .....	61
A- Animaux.....	61
B- Lait cru .....	62
I. 1. 2. Matériels de laboratoire.....	62
A. Matériels utilisés pour l'extraction d'ADN .....	62
B. Matériels utilisés pour la quantification de l'ADN .....	63
C. Matériels utilisés pour la PCR en temps réel.....	63
I. 2. Méthodes .....	66
I. 2. 1. Prélèvements de lait.....	66
I. 2. 2. Extraction de l'ADN génomique directement sur des échantillons de lait.....	67
A- Préparation de l'ADN bactérien.....	67
B- Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN extrait obtenue par spectrophotométrie .....	71
I. 2. 3. PCR en temps réel.....	74
A- Amplification du gène <i>IS711</i> par PCR en temps réel (détection de <i>Brucella</i> spp). .....	74
B- Amplification du gène <i>hlyA</i> par PCR en temps réel (détection de <i>L. monocytogenes</i> ).....	78
II. RESULTATS.....	80
II. 1. Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN extrait obtenue par spectrophotométrie....	80

II. 2. Amplification du gène IS711 par PCR en temps réel (Détection de <i>Brucella</i> spp.) .....	84
II. 3. Amplification du gène <i>hlyA</i> par PCR en temps réel (Détection de <i>L. monocytogenes</i> ).....	89
III. DISCUSSION .....	91
III. 1. Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN extrait par spectrophotométrie .....	91
III. 2. Amplification du gène IS711 par PCR en temps réel (Détection de <i>Brucella</i> spp.) .....	92
II. 3. Amplification du gène <i>hlyA</i> par PCR en temps réel (Détection de <i>L. monocytogenes</i> ).....	95
CONCLUSION .....	101
Références.....	103
Résumé.....	146
ملخص.....	147
Abstract .....	148
Annexe N° 1 .....	149
Annexe N° 2 .....	158
Annexe N° 3 .....	165



## LISTE DES FIGURES

Figure N° 1 : Espèces et biovars de <i>Brucella</i> (Garin-Bastuji, 2014).....	24
Figure N° 2 : Mode de contamination de la brucellose humaine (Tabet-Derraz <i>et al.</i> , 2012).....	30
Figure N° 3 : Le cycle d'infection de <i>L. monocytogenes</i> chez l'homme (Moroni, 2007). ....	49
Figure N° 4 : Etapes de l'infection de la cellule par <i>L. monocytogenes</i> et les facteurs de virulence impliqués (Morillon et Garnotel, 2008).....	51
Figure N° 5 : Protocole simplifié d'extraction de l'ADN.....	70
Figure N° 6 : Résultat type de lecture sur NanoDrop de l'échantillon N°55 .....	80
Figure N° 7 : Répartition des concentrations en ADN totaux extraits à partir des échantillons de lait..	81
Figure N° 8 : Répartition des ratios $DO_{260}/DO_{280}$ représentant le niveau de contamination des extraits d'ADN par les protéines.....	82
Figure N° 9 : Répartition des ratios $DO_{260}/DO_{230}$ présentant le niveau de contamination des extraits d'ADN par les sels chaotropiques .....	83
Figure N° 10 : Résultats obtenus après amplification du gène <i>IS711</i> par PCR en temps réel .....	84
Figure N° 11 : Courbes logarithmiques d'amplification de l'un des 2 échantillons positifs et des deux contrôles positifs (Signal FAM seulement).....	85
Figure N° 12 : Courbe logarithmique d'amplification de l'un des 2 échantillons positifs.....	85
Figure N° 13 : Courbes logarithmiques d'amplification de l'échantillon positif, contrôles positifs, négatifs et échantillons négatifs inclus (Signal FAM seulement) .....	86
Figure N° 14 : Courbe logarithmique d'amplification de l'échantillon positif (contrôles positifs, négatifs et échantillons négatifs inclus).....	87
Figure N° 15 : Différentes valeurs de Ct des deux échantillons positifs et des contrôles positifs et négatifs .....	88
Figure N° 16 : Courbes linéaires d'amplification des échantillons, des contrôles positifs et négatifs (signal FAM et Cy5).....	89
Figure N° 17 : Courbes logarithmiques d'amplification des échantillons, des contrôles positifs et négatifs (signal FAM et Cy5).....	90

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau N° 1: Principales modifications physiopathologiques résultant d'une mammite et donnant lieu à un type de tests de détection (Kitchen, 1981 ; Hamann et Zeconi, 1998).....	10
Tableau N° 2: Répartition (en%) des différents types cellulaires dans le lait de vache en l'absence et en présence d'infection mammaire (Lee <i>et al.</i> , 1980). .....	11
Tableau N° 3: Grille d'interprétation du California Mastitis Test (CMT) (RCRMB, 2010 ; Guyot <i>et al.</i> , 2014).....	14
Tableau N° 4: Composition du lait de vache (Alais et Linden, 2004). .....	18
Tableau N° 5 : Situation nationale de l'assainissement des bovins laitiers contre la Brucellose (de 2002 à 2007) (DSV, 2007). .....	27
Tableau N° 6 : Prévalence rapportée de la brucellose bovine endémique dans certains pays (Rahman, 2015).....	28
Tableau N° 7 : Sensibilité et spécificité des différentes techniques de diagnostic sérologique (Lefevre <i>et al.</i> , 2003 ; Acha et Szyfres, 2005). .....	37
Tableau N° 8 : Caractères biochimiques d'identification de <i>L. monocytogenes</i> d'après Don Warbuton <i>et al.</i> , (2012) .....	44
Tableau N° 9 : Structure antigénique des sérotypes de <i>L. monocytogenes</i> d'après Farber et Peterkin (1991) .....	45
Tableau N° 10 : Les critères pour valider une interprétation de la détection de <i>Brucella</i> (fabricant du Kit BactoReal® Kit <i>Brucella</i> spp., 2014),.....	77
Tableau N° 11 : Les critères pour valider une interprétation de la détection de <i>Listeria monocytogenes</i> (fabricant du Kit BactoReal® Kit <i>Listeria monocytogenes</i> , 2015), .....	79
Tableau N° 12 : Concentration et pureté des ADN obtenus par extraction à partir des différents échantillons de lait testés .....	165

## LISTE DES PHOTOS

Photo N° 1 : Poste Sécurité Microbiologique classe II : Stérile – VBH.....	158
Photo N° 2 : Centrifugeuse de bureau (Centri-boule).....	158
Photo N° 3 : Durant l'extraction, le lait est maintenu dans de la glace pilée.....	158
Photo N° 4 : Double emballage des prélèvements, et homogénéisation du lait avant la prise d'essai.	158
Photo N° 5 : Identification des tubes de 1,5 ml avec le nom de l'échantillon à extraire .....	158
Photo N° 6 : Prise d'essai .....	158
Photo N° 7 : Séparation du lait en deux couches après centrifugation. ....	158
Photo N° 8 : Elimination du surnageant .....	159
Photo N° 9 : Conservation du culot .....	159
Photo N° 10 : Ajout de PBS .....	159
Photo N° 11 : Bain marie (Julabo SW 22).....	159
Photo N° 12 : Vortex (IKA Vortex GENIUS 3).....	159
Photo N° 13 : Carrier RNA reconstitué et aliquoté à – 20°C. ....	159
Photo N° 14 : Prélèvement de Buffer LA pour la préparation de la solution de lyse LA-carrier.....	159
Photo N° 15 : Solution de lyse LA-carrier aliquoté à – 20°C.....	159
Photo N° 16 : Protéinase K.....	160
Photo N° 17 : Prélèvement du lait prétraité .....	160
Photo N° 18 : Solutions du kit d'extraction.....	160
Photo N° 19 : Chargement des colonnes BioExtract® Mini Spin Column. ....	160
Photo N° 20 : Lavage de l'ADN extrait par Buffer W1. ....	160
Photo N° 21 : Lavage de l'ADN extrait par Buffer W2. ....	160
Photo N° 22 : Séchage de la membrane de silice par centrifugation. ....	160
Photo N° 23 : Dépôt de Buffer EL au centre de la membrane de silice. ....	160
Photo N° 24 : ADN élué après centrifugation. ....	160
Photo N° 25 : Elimination de la colonne BioExtract® Mini Spin Column. ....	161
Photo N° 26 : Récupération de l'ADN. ....	161
Photo N° 27 : Fermeture du tube par un parafilm.....	161
Photo N° 28 : Ajout de l'ARNase.....	161
Photo N° 29 : Incubation de l'ADN extrait .....	161
Photo N° 30 : Extrait d'ADN.....	161
Photo N° 31 : Conservation de l'ADN extrait et Kits de détection dans un congélateur à – 20°C. ....	161
Photo N° 32 : NanoDrop relié à un microordinateur.....	162
Photo N° 33 : NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).....	162
Photo N° 34 : Pose de l'essai à blanc. ....	162
Photo N° 35 : Nettoyage des deux surfaces optiques avec un papier absorbant.....	162
Photo N° 36 : Dépôt de 1 µl de l'échantillon de l'ADN dans la cellule de l'appareil. ....	162
Photo N° 37 : Bras du levier abaissé .....	162
Photo N° 38 : Plaques optiques de 96 puits avec code barre (Ref : 4306737).....	163
Photo N° 39 : Films Optiques Adhésifs Starter Kit (Ref : 4311971).....	163
Photo N° 40 : Thermocycleur ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems) relié à un Microordinateur. .....	163
Photo N° 41 : Kit de BactoReal® Kit <i>Brucella</i> spp. de 100 tests, référence DVEB02113 .....	163

Photo N° 42 : Préparation du Master mix.....	163
Photo N° 43 : Extraits d'ADN maintenus dans de la glace pilée.....	163
Photo N° 44 : Prélèvement de l'ADN extrait. ....	163
Photo N° 45 : Pose de l'ADN dans le puits de la plaque.....	163
Photo N° 46 : Pose du Film Optique Adhésif sur la plaque optique.....	164
Photo N° 47 : Plaque optique juste avant de commencer la PCR.....	164
Photo N° 48 : Pose de la plaque dans la Centrifugeuse. ....	164
Photo N° 49 : Programmation des échantillons et contrôles. ....	164
Photo N° 50 : Programmation du profil thermique.....	164
Photo N° 51 : Charge de la plaque optique dans le Thermocycleur. ....	164

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
AFNOR : Association Française de Normalisation  
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
AIM : Arrêté interministériel  
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
ARN : Acide RiboNucléique  
ATP : adenosine 5' -triphosphate  
*B* : *Brucella*  
BCSP : *Brucella* cell surface protein  
BPA : Buffered Plate Agglutination  
BvrR : *Brucella* virulence related regulatory protein  
BvrS : *Brucella* virulence related sensory protein  
CCI : Comptage Cellulaire Individuel  
CCS : Concentration en Cellules Somatiques  
CMT : Californian Mastitis Test  
CNR : Centre National de Référence  
CNS : Staphylocoques à Coagulase Négative  
CPI : Contrôle Positif Interne  
CPS : Staphylocoques à Coagulase Positive  
Ct : Cycle Threshold (Cycle seuil)  
DO: Densité Optique  
DSV : Direction des Services Vétérinaires  
*E. coli* : *Escherichia Coli*  
EAT : Epreuve Antigène Tamponné  
ECA : Epreuve Cutanée Allergique  
EN : Norme Européenne  
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay  
FC : Fixation de Complément  
Fg : femtogramme :  $10^{-15}$  g  
g/l : gramme par litre  
ID : IntraDermique  
Ig : Immunoglobuline  
INMV : Institut National de la Médecine Vétérinaire  
INSP : Institut National de Santé Publique Algérie  
*IS711* : Séquence d'Insertion 711  
ISO : International Standard Organization  
J-C : Jésus Christ  
JORADP : Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire  
JORF : Journal officiel de la République Française  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
Kg : kilogramme  
l : litre  
*L.* : *Listeria*  
LLO : lystériolysine O  
LPS : lipopolysaccharide  
 $\mu$  : micron  
 $\mu$ g : microgramme



ml : millilitre  
µl : microlitre  
mm : millimètre  
µm : micromètre  
MOX : Oxford modifié  
NF : Norme Française  
ng : nanogramme :  $10^{-9}$  g  
nm : nanomètre  
OIE : Office international des épizooties = Organisation Mondiale de la Santé Animale  
Omp = Outer membrane protein  
OMS/FAO : Organisation Mondiale de la Santé / Food and agriculture organization  
OXA : Oxford  
PAL : PALCAM  
pb : Paire de base  
PBS : Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin  
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase  
*Per* : gene de la pérosamine synthétase  
pH : Potentiel Hydrogène  
PSM : Poste Sécurité Microbiologique  
qPCR : PCR quantitative (PCR en temps réel)  
R : rough pour rugueuse  
RBT : Test de Rose Bengale  
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux  
Rev1: souche vaccinale de *B. melitensis* biovar 1  
RT : Ring Test ou l'épreuve de l'anneau sur le lait  
S19 : souche vaccinale 19 de *B. abortus* biovar 1  
S : smooth pour lisse  
SAW : Séro-agglutination de Wright  
Se : Sensible  
sec : seconde  
Sp : spécifique  
TPF : Test de Polarisation de la Fluorescence  
TRB : Test de coloration au Rose Bengale  
UI : unité internationale  
UV: Ultraviolet  
°C : Degré Celsius  
°D : degré Dornic  
% : pour cent

## INTRODUCTION

Dans les pays en voie de développement, les récentes croissances rapides de la population et leur urbanisation accrue, ont entraîné l'augmentation rapide de la demande d'aliments, particulièrement des aliments d'origine animale. Nourrir les villes est donc devenu un défi pour les gouvernements de ces pays.

Actuellement, le lait constitue un des principaux produits de base de notre régime alimentaire journalier avec le pain, la semoule, le sucre et le café. Il est un aliment nutritif, complet et idéal couvrant tous les besoins de l'organisme, principalement durant les premiers mois de la vie. Il est consommé en grandes quantités sous forme de lait de consommation, de produits laitiers variés ou sous forme cachée dans diverses préparations alimentaires (conserves, crèmes glacées, plats cuits...).

En Algérie, le lait occupe une place importante dans la ration alimentaire de chacun, notamment les populations à faibles revenus qui recourent généralement à la consommation de lait parce que, d'une part, en tant que produit très riche en nutriments il peut suppléer à d'autres produits coûteux tels que la viande, et d'autre part, il est subventionné par l'Etat. Ainsi, en Algérie en 1990, le lait a compté pour 65,5 % dans la consommation de protéines d'origine animale, devançant largement la viande (22,4 %) et les œufs (12,1 %) (Amellal, 1995).

L'Algérie est l'un des plus grands consommateurs de lait en Afrique avec une moyenne annuelle de 110 à 115 litres par habitant, créant ainsi une situation de dépendance vis-à-vis de l'étranger en matière d'approvisionnement en lait (Kabir, 2015).

Les besoins en lait pour la consommation en Algérie, sont estimés à 3,2 milliards de litres annuellement alors que la couverture assurée actuellement par la production nationale ne dépasse pas les 2,3 milliards de litres, le reste des besoins est couvert par l'importation de poudres de lait (lait sec, lait infantile, farine lactée...) et matière grasse de lait anhydre servant au processus de recombinaison dans les unités de transformation des laits et produits laitiers (Kabir, 2015).

L'Algérie se place au troisième rang mondial en matière d'importation de lait et de produits laitiers. En 2006, plus de 500 millions de dollars ont été dépensés pour l'importation de lait en poudre (Mouffok, 2007 ; Rahal *et al.*, 2009).

Cette importation est la résultante de nombreuses entraves qui limitent le développement de l'élevage bovin dans notre pays. Les aléas climatiques tels que la

sécheresse et la faible pluviométrie constatées durant ces deux dernières décennies, l'aridité du sol, la production fourragère limitée, la mauvaise conduite d'élevage des troupeaux et les aspects de rationnement et de nutrition généralement mal maîtrisés réduisent considérablement les productions animales. De même, les pathologies de la reproduction (métrites, pyométries, rétentions placentaires...), et les intervalles vêlage/vêlage prolongés chez les bovins laitiers, ainsi que la présence et la persistance de certaines pathologies majeures telles que la brucellose et la tuberculose et autres entités pathologiques telles que les mammites surtout dans leur forme sub-clinique jouent un rôle déterminant dans la réduction de la production laitière. Les diarrhées néonatales, la mortalité des veaux nouveau-nés et les boiteries, et enfin la faible quantité de lait collecté, intégrée dans l'industrie laitière représentent les contraintes et les causes prédominantes qui influencent directement les caractéristiques quantitatives de la production laitière en Algérie (Kabir, 2015).

Environ 20% de la production de l'industrie laitière mondiale est perdue suite à des cas de mammites modérés à sévères (Berry et Hillerton, 2002). En effet, la mammite est la maladie de la vache laitière qui cause le plus de pertes économiques au producteur car elle entraîne, une diminution de la production laitière de 15 à 45% par quartier atteint (Bhutto *et al.*, 2012), une augmentation des coûts de traitements, du travail journalier et de la mortalité, l'absence de commercialisation du lait des vaches traitées, l'abattage précoce des animaux (Sargeant *et al.*, 2001). Cette pathologie de production présente également diverses conséquences pour le transformateur (diminution de la teneur en protéines, perturbations des fermentations microbiennes) et pour le consommateur du lait et de ses dérivés (risques d'allergies liées aux antibiotiques, par exemple).

Tout animal malade est susceptible de transmettre un agent pathogène par le lait ou par la viande. En particulier, les animaux atteints de brucellose fournissent du lait contaminé en agents infectieux qui sont des *Brucella*.

La brucellose bovine est une zoonose majeure qui peut avoir un impact important sur la santé publique, la transmission se faisant généralement par la consommation de lait cru contaminé (Calvet *et al.*, 2010).

Malgré les diverses mesures de lutte prises dans de nombreux pays, la brucellose humaine et animale ne semblent pas régresser dans le monde, mais au contraire elles tendent à prendre de l'importance surtout dans les pays en voie de développement.

En Algérie, la brucellose sévit de manière enzootique dans les élevages bovins. Afin d'éradiquer cette zoonose, un programme national de lutte contre la brucellose a été mis en

place (1995). Celui-ci repose sur le dépistage sérologique par l'épreuve à l'antigène tamponné et la réaction de fixation du complément comme test de confirmation, et les animaux positifs sont éliminés par un abattage sanitaire.

Cependant, la spécificité des tests sérologiques est relative du fait de l'existence de réactions croisées avec d'autres bactéries ; la sensibilité varie selon le type de technique utilisée. Le sérodiagnostic est souvent un diagnostic de suspicion.

En 1990, le premier diagnostic direct par PCR pour la détection du genre *Brucella* a été mis au point, basé sur la détection du gène *omp43* de *B. abortus* S19 (Fekete *et al.*, 1990).

La technique de PCR en temps réel, qui a l'avantage de présenter une meilleure spécificité qu'une PCR conventionnelle grâce à l'utilisation d'une sonde, est maintenant très utilisée pour la détection du genre *Brucella* (Bogdanovich *et al.*, 2004). La présence de la séquence d'insertion IS711 est très spécifique des bactéries du genre *Brucella* et représente une cible de choix pour l'identification de cette bactérie.

Les maladies transmises par les aliments constituent une menace considérable pour la santé humaine. Le lait cru ou non pasteurisé peut contenir des bactéries comme *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) qui peut causer une maladie d'origine alimentaire et entraîner de graves problèmes de santé publique.

Bien que l'exposition à *L. monocytogenes* soit très fréquente, la listériose reste une maladie rare, mais grave lorsqu'elle atteint des personnes à risque, provoquant de la septicémie, de la méningite, des avortements ou parfois de la mortalité. Des études récentes réalisées par des chercheurs de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont montré qu'en 2010, la listériose a infecté 23 150 patients et le taux de mortalité était 23,59%, soit environ 5463 décès (Charline *et al.*, 2014).

La législation algérienne a rendu obligatoire la recherche de *L. monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers (Arrêté du 25 septembre 2005, JORA N° 3). Il est important d'utiliser des méthodes rapides et efficaces de détection et d'identification de *L. monocytogenes* afin de la détecter le plus tôt possible dans la chaîne alimentaire pour développer ensuite les moyens de prévention appropriés.

La technique de PCR en temps réel qui repose sur l'amplification par PCR d'une séquence nucléique spécifique de *L. monocytogenes* a facilité l'utilisation en routine de la méthode d'amplification génique. Les séquences amplifiées sont variables, elles sont souvent dérivées des gènes de virulence spécifiques à *L. monocytogenes*, telle celle de la listériolysine (*hlyA*).

La présente étude a pour objet de détecter la présence des *Brucella* spp. chez des vaches laitières testées auparavant séronégatives et de *L. monocytogenes* dans le lait cru dans la région de Batna afin d'évaluer le risque encouru par le consommateur de lait cru dans la région d'étude.

Notre thèse comprend deux parties :

- La première partie bibliographique fait le point en quatre chapitres, sur des généralités concernant les mammites bovines, puis un aperçu général sur le lait cru, puis quelques rappels sur les deux zoonoses alimentaires objets de notre travail, brucellose et listériose;
- La deuxième partie expérimentale comprend les objectifs visés par notre étude, le matériel et les méthodes utilisés pour conduire cette thèse et qui ont permis l'obtention des résultats qui sont, par la suite, discutés.



# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE I : RAPPELS SUR LES MAMMITES

### I. 1. Définition

Une mammite désigne, par définition, une inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle due généralement à une infection bactérienne (Hanzen, 2008). Une mammite peut être causée aussi par des levures (*Candida*), des algues microscopiques, ou un traumatisme de la mamelle, mais ces causes sont beaucoup plus rares (Reyher *et al.*, 2011). Elles peuvent également être dues à des désordres physiologiques ou à des traumatismes locaux. Les infections mammaires peuvent être ou non associées à des signes cliniques, on distingue alors les mammites cliniques des mammites subcliniques (Seegers *et al.*, 1997).

#### I. 1. 1. Mammites cliniques

Les mammites cliniques sont caractérisées par la présence de symptômes fonctionnels représentés surtout par des modifications macroscopiquement visibles de la quantité, de la qualité et de l'aspect du lait, de symptômes locaux inflammatoires observés au niveau de la mamelle ; douleur, chaleur, tuméfaction etc., et de symptômes généraux comme l'hyperthermie, l'anorexie, l'arumination.

En pratique, on considère qu'il y a mammite clinique dès qu'il y a une modification de l'aspect du lait ou de la sécrétion de la mamelle qui est le critère le plus précoce et le plus constant. Enfin, selon la gravité et la simultanéité des symptômes, on distingue, par ordre décroissant de gravité, les mammites cliniques suraiguës, aiguës et subaiguës (Gedilaghine, 2005 ; Hanzen, 2008).

#### I. 1. 2. Mammites sub-cliniques

Une mammite sub-clinique, par contre, n'engendre aucune modification au niveau de l'état général de l'animal. Elle se caractérise par une absence de changements visibles au niveau de la glande mammaire et dans le lait ainsi qu'une augmentation des cellules somatiques (c'est-à-dire les cellules épithéliales mammaires mortes et leucocytes) (Bhutto *et al.*, 2012). En outre, elle peut se prolonger dans le temps et persister plusieurs mois et devenir chronique.

Les infections sub-cliniques sont responsables d'environ 80 % de l'ensemble des pertes économiques associées aux mammites, liées à une réduction de la production et de la qualité du lait, ainsi qu'aux coûts de traitements et de préventions (Seegers *et al.*, 2003 ; Shim *et al.*, 2004 ; Petrovski *et al.*, 2006 ; Wallemacq *et al.*, 2010).

## I. 2. Etiologie

La grande majorité des mammites sont d'origine infectieuse. Cependant on note l'existence de mammites d'origine traumatique, physique ou chimique.

L'infection de la mamelle par voie exogène est de loin la plus fréquente, bien que des infections par voie endogène soient décrites, notamment par des mycoplasmes. Il faut noter aussi l'excrétion possible de micro-organismes dans le lait sans qu'il n'y ait de signes cliniques de mammite associés, par exemple lors de tuberculose, para-tuberculose, salmonellose, listériose et brucellose.

La plupart des infections sont d'origine bactérienne. Les mammites mycosiques sont rares (Noireterre, 2006). Les espèces bactériennes impliquées dans les infections mammaires de la vache sont présentes sur et chez l'animal lui-même ou dans son environnement (Lerondelle, 1985 ; Perrin Couilloud, 1992).

Par ailleurs, les bactéries responsables de mammites sont toutes capables de se multiplier dans le lait, qui est un milieu nutritif suffisamment riche pour assurer leur développement (Lerondelle, 1985).

Généralement une seule espèce bactérienne est en cause, plus rarement l'association de deux espèces est possible. On considère d'ailleurs que la présence de plus de deux germes dans un lait de mammite signe une contamination du prélèvement.

Traditionnellement on classe les espèces bactériennes responsables de mammites en deux groupes

### I. 2. 1. Espèces pathogènes majeures

Elles sont potentiellement responsables de mammites cliniques et regroupent les streptocoques (*Streptococcus uberis*, *Str. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, *Str. agalactiae*), les entérocoques (*Enterococcus faecalis*...), les staphylocoques à coagulase positive (CPS) (*Staphylococcus aureus subsp. aureus*), ainsi que les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*...). Ces trois familles de germes sont responsables de la majorité des mammites cliniques, à hauteur de 80-90 %. (Fabre *et al.*, 1997a ; Argente *et al.*, 2005).

Sont plus rarement isolés *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, des mycoplasmes et des bactéries anaérobies.

### I. 2. 2. Espèces pathogènes mineures

Elles sont exceptionnellement responsables de mammites cliniques, mais plutôt de mammites sub-cliniques. Ce sont essentiellement les staphylocoques à coagulase négative

(CNS) (*S. xylosum*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*...). Ce sont les germes de la flore normale de la peau du trayon et peuvent provoquer une infection (clinique ou sub-clinique) à la faveur d'un dysfonctionnement du sphincter du trayon (Sears et McCarthy, 2003).

Mais cette dichotomie entre pathogènes majeurs et pathogènes mineurs tend actuellement à être remise en cause devant la part croissante des isollements de staphylocoques à coagulase négative dans les laits de mammites cliniques (Myllys *et al.*, 1994).

### I. 3. Diagnostic

La difficulté n'est pas de reconnaître une mammite clinique dont les symptômes sont patents. L'enjeu est de reconnaître une infection mammaire aussi précocement que possible. La détermination précoce de ces infections permet la mise en place rapide de traitement augmentant notablement les chances de guérison et évitant ainsi le passage à la chronicité. Toutefois les infections mammaires peuvent s'exprimer de façons très différentes en fonction du type de germe rencontré et de l'état physiologique de l'animal. Un diagnostic étiologique peut s'avérer utile.

Il existe actuellement plusieurs méthodes de diagnostic des infections intra-mammaires. Nous allons passer en revue ces différentes techniques (Bouaziz, 2005).

#### I. 3. 1. Examen clinique

L'examen clinique de la mamelle et des sécrétions mammaires constitue le pilier de la démarche de diagnostic des mammites. C'est le moyen le plus simple et le moins onéreux disponible. L'examen clinique de la mamelle s'effectue en trois temps : Examen visuel de la mamelle, palpation de la mamelle et examen visuel des sécrétions mammaires (Allain, 2011).

\* **Examen visuel de la mamelle** : Il s'agit d'évaluer les caractères physiques de la mamelle afin de détecter des modifications perceptibles à l'examen de l'animal à distance.

\* **Palpation de la mamelle** : Elle est réalisée sur une mamelle vide après la traite. Elle permet d'observer la qualité de la peau qui recouvre l'organe, la texture et les anomalies perceptibles dans le conjonctif, la présence de signes inflammatoires (douleur, rougeur, tuméfaction et chaleur), la présence d'une lymphadénite. Cette palpation permettrait un diagnostic précoce de certaines affections et le pronostic des infections anciennes ou chroniques (Durel *et al.*, 2004)

\* **Examen macroscopique des sécrétions mammaires** : On doit chercher à apprécier les modifications de la qualité des sécrétions mammaires telles que la couleur (jaune au rouge

sombre), le goût et l'odeur (odeur d'œuf pourri en cas d'infection par les germes pyogènes), la consistance, la viscosité, et l'homogénéité peuvent aussi être évaluées.

L'examen clinique de la mamelle et du lait permet de mettre en évidence un processus inflammatoire qui peut être induit par une infection. Ce processus inflammatoire est proportionnel au caractère pathogénique du germe en cause. Ainsi certains germes vont avoir tendance à provoquer des mammites aiguës alors que d'autres germes ne provoquent que des symptômes plus frustes (Poutrel, 2002).

Alors que la mammite clinique se diagnostique surtout par l'observation des signes cliniques généraux et locaux associés. Pour ce faire, l'éjection des premiers jets ou encore la palpation systématique des quartiers suspects constituent des gestes classiquement pratiqués pour déceler des modifications du lait ou de la mamelle (Theron, 2014).

### **I. 3. 2. Examen bactériologique**

Les techniques de culture bactériennes classiques représentent la méthode standard par excellence pour le diagnostic des agents pathogènes responsables et la mise en évidence de la mammite (Sargeant *et al.*, 2001; Viguié *et al.*, 2009), mais, pour des raisons de coût, de délai, de bonne asepsie aussi bien pour le prélèvement de l'échantillon que pour son exploitation et sa difficulté d'interprétation, il ne doit pas être systématique et il doit être réservé aux circonstances où il s'avère indispensable: flambée de mammites cliniques dans un troupeau, mammites récidivantes ne rétrocedant pas au traitement, suspicion de mammites à *Nocardia* ou à mycoplasmes (Bouchot *et al.*, 1985 ; Poutrel, 1985).

#### **A- Prélèvement de lait**

##### **A- 1- Technique de prélèvement**

A la sortie de la mamelle saine, même avec des précautions d'asepsie rigoureuse, il est très rare d'obtenir un lait stérile, il y a presque toujours à l'intérieur de la mamelle des germes banaux (Poutrel, 1985). Les prélèvements s'effectuent au niveau de la mamelle juste avant la traite. Le lait est collecté dans un flacon stérile après un lavage du trayon et des parties basses de la mamelle avec de l'eau additionnée de 2 à 6 gouttes de Javel concentrée à 32 degré chlorométrique par litre, essuyage avec une serviette propre puis désinfection de l'orifice du canal avec de coton imbibé d'alcool à 70°. Le lait des quartiers les plus proches puis des plus éloignés est prélevé, en maintenant le tube ouvert incliné près de l'extrémité du trayon. Les premiers jets ont été éliminés pour nettoyer le canal du trayon de ses bactéries saprophytes. Les échantillons de lait sont identifiés et immédiatement transportés dans l'heure qui a suivi la



réalisation du prélèvement au laboratoire dans des conditions strictes de réfrigération à 4°C (Bouchot *et al.*, 1985 ; Ben Hassen *et al.*, 2003).

#### **A- 2- Transport et conservation des échantillons**

Tout prélèvement de lait ne pouvant être transporté au laboratoire dans l'heure qui suit doit être réfrigéré immédiatement à 4°C pour être analysé dans les 24 heures ou congelé à -18°C (Serieys, 1985a ; Berthelot *et al.*, 1997 ; Ben Hassen *et al.*, 2003). Par ailleurs, la congélation est déconseillée car elle réduit le nombre de germes par rapport à la réalité ainsi qu'elle affecterait particulièrement la croissance de certaines bactéries notamment des streptocoques et des colibacilles (Bouchot *et al.*, 1985 ; Poutrel, 1985 ; Faroult, 1998 ; Ben Hassen *et al.*, 2003 ).

### **B- Analyse bactériologique**

#### **B- 1- Modalités de l'ensemencement**

L'échantillon doit être soigneusement agité car les bactéries se concentrent dans la crème du lait. Un aliquote de 0,025 ml de l'échantillon est étalé à l'aide d'une anse calibré sur une gélose au sang qui permet d'isoler pratiquement toutes les espèces bactériennes, des milieux sélectifs qui permettent d'isoler l'espèce bactérienne que l'on a choisi à priori et qui n'est sans doute pas celle qui est à l'origine de l'infection (Serieys, 1985a ; Lamarche *et al.*, 2000 ; Gambo et Agnem-Etchike, 2001). Après 24 heures d'incubation à 37°C, on procède à l'identification des colonies selon les techniques classiques. Le prélèvement est considéré comme positif lorsque le nombre et la nature des colonies présentent un aspect homogène et que leur nombre dépasse 250 unités formant colonies (Messadi *et al.*, 1991 ; Monsallier, 1994 ; Hogan et Larry Smith, 2003). D'après la Fédération Internationale de Laiterie et de certains auteurs, on considère comme responsable d'une infection, un micro-organisme isolé en culture pure ou prédominant au sein des micro-organismes trouvés (Plommet et Roguinsky, 1968 ; Flinois et David, 1977 ; Fabre *et al.*, 1997b). Et dans le cas de l'apparition de deux espèces bactériennes simultanément dans la culture :

- Si les deux espèces appartiennent à la même catégorie (germes pathogènes majeurs), les deux sont prises en compte (Fabre *et al.*, 1997b).
- Si l'une de deux espèces fait partir des pathogènes majeurs (comme *Staphylococcus aureus*) et l'autre des pathogènes mineurs (Staphyloque coagulase négative), seule celle de la première catégorie est prise en compte (Fabre *et al.*, 1997b).

## B- 2- Identification des souches

Selon les méthodes classiquement recommandées, l'identification d'espèce est effectuée à l'aide des galeries standardisées (API system Bio-Mérieux) (Coullioud *et al.*, 1991 ; Berthelot *et al.*, 1997 ; Berry et Hillerton, 2002).

### I. 3. 3. Méthodes alternatives

La colonisation de la mamelle, normalement stérile, par une espèce bactérienne conduit à des modifications plus ou moins importantes de la composition du lait, selon la sévérité de l'infection (Poutrel, 2002).

Lorsqu'une mamelle ou plus précisément un quartier est infecté, de nombreuses modifications physiopathologiques (tableau N° 1) surviennent, ce qui rend possible divers dosages ou dénombrements qui cependant doivent être évalués du point de vue de leurs performances pour la détection indirecte des mammites. Au fur et à mesure des années et de l'avancée des connaissances scientifiques dans le domaine, plusieurs tests ont ainsi été proposés qui diffèrent de par leur sensibilité, spécificité, valeurs prédictives, simplicité, rapidité et coût (Kitchen, 1981).

**Tableau N° 1: Principales modifications physiopathologiques résultant d'une mammite et donnant lieu à un type de tests de détection (Kitchen, 1981 ; Hamann et Zecconi, 1998)**

Modifications de composition du lait causées par	Tests et méthodologie
Le système immunitaire de l'animal	Comptage Cellulaire Somatique : - Observation directe au microscope - Analyse automatique de la taille des particules cellulaires - Coloration fluorescente des noyaux cellulaires - Tests d'augmentation de viscosité - Dosage chimique de l'ADN - Dosage de métabolite cellulaire (ATP)
La réduction des capacités de synthèse de la glande mammaire	Dosage du lactose : - Colorimétrie - Méthode infra-rouge
Les dommages cellulaires et la perméabilité des capillaires sanguins	Serum Albumine Bovine : - Immunodiffusion - Immunoélectrophorèse Na, K, Cl : - Photométrie de flamme (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ) - Chimie (Cl <sup>-</sup> ) - Electrodes spécifiques des ions - Mesure de conductivité Enzymes : - Catalase - N-acetyl-β-D-glucosaminidase - LDH

**A- Comptages cellulaires somatiques****A- 1- Types cellulaires présents dans le lait de vache**

Comme tout liquide biologique, le lait, même normal, contient des cellules somatiques hétérogènes. Elles sont, en effet, essentiellement constituées de globules blancs (macrophages, polynucléaires neutrophiles et lymphocytes) de la circulation sanguine et de cellules épithéliales provenant de la desquamation des épithéliums des canaux galactophores, des acini et lors de l'érosion du tissu glandulaire (Brouillet et Raguet, 1990 ; Badinand, 1994 ; Le Page, 1999). Les différentes cellules retrouvées dans le lait évoluent en nombre et en proportion suivant le stade physiologique de l'animal. En l'absence d'infection, les macrophages constituent le type cellulaire dominant et ce n'est qu'en cas d'infection du quartier que les polynucléaires neutrophiles affluent dans le lait où ils deviennent les plus nombreux. Quant aux autres types cellulaires, ils sont peu représentés, notamment les lymphocytes et les cellules épithéliales qui sont très peu nombreuses dans le lait des quartiers non infectés (Riollet *et al.*, 1999) (tableau N° 2).

**Tableau N° 2: Répartition (en%) des différents types cellulaires dans le lait de vache en l'absence et en présence d'infection mammaire (Lee *et al.*, 1980).**

Type cellulaire	Mamelle	
	Saine	infectée
Polynucléaires neutrophiles	0 - 11	50 - 90
macrophages	66 - 88	0,2 - 2
lymphocytes	10 - 27	2,8 - 5,1

Durant la lactation, le comptage cellulaire d'un lait normal, issu des quartiers exempts d'infection est lié à la production de l'animal par un phénomène de dilution. Il est élevé au début de lactation (pendant le premier mois) et lors des phases qui précèdent le tarissement il est minimal durant la période allant du deuxième au septième mois (Brouillet et Raguet, 1990 ; Meissonnier, 1995).

En dehors de l'état sanitaire de la mamelle, des facteurs physiologiques peuvent avoir un effet sensible non négligeable sur la concentration cellulaire du lait. En particulier, l'effet d'un stress, augmentation de la température, traite traumatisante, des carences minérales ou vitaminiques, un effort physique important et l'âge peuvent entraîner des variations sensibles mais de courte durée de la concentration cellulaire (Brouillet et Raguet, 1990 ; Coulon *et al.*, 1996 ; Coulon, 1999 ; Faroult, 2000).

Lors d'infection, il y a un appel leucocytaire important qui se caractérise par une augmentation de comptage cellulaire et des modifications considérables dans la répartition des

populations dans le lait. Si bien que les polynucléaires neutrophiles deviennent très nombreux et majoritaires (Badinand, 1994 ; Paape *et al.*, 1999).

#### A- 2- Méthodes de numération cellulaire

L'infection intra-mammaire se traduit le plus souvent, par une élévation de la concentration en cellules somatiques (CCS). Le diagnostic est basé sur la mesure directe de la (CCS) ou indirecte par Californian Mastitis Test (CMT) des cellules présentes dans le lait (Bouaziz, 2005).

Les cellules présentes dans le lait sont pour la majorité d'entre elles d'origine sanguine. La numération des cellules sanguines peut être réalisée directement au microscope après étalement et coloration ou à l'aide d'appareils automatiques de type Coulter Counter ou Fossomatic ou indirectement par des tests tels les tests de la catalase, le test de Whiteside, le Californian Mastitis Test, le Brabant Mastitis Test ou par la mesure du taux d'ATP. Ces méthodes indirectes ne distinguent pas les leucocytes des cellules épithéliales. Un lait normal peut parfois comporter 50.000 cellules dont 80 % de cellules épithéliales (Hanzen, 2009).

#### A- 2- 1- Concentration cellulaire somatique du lait (CCS)

- **Comptage par la méthode microscopique directe**

Le comptage direct au microscope a été délaissé au profit du comptage électronique plus rapide réalisé sur le lait de mélange des quatre quartiers de chaque vache du troupeau (CCI : Comptage Cellulaire Individuel), réalisé dans le cadre du contrôle laitier (prélèvements mensuels) ou dans le cadre d'un plan de prophylaxie des mammites (Hanzen, 2009).

Pour le comptage à l'aide de la cellule de THOMA, le prélèvement est d'abord mélangé avec le liquide de dilution, et le comptage se fait au microscope après dépôt d'une goutte du prélèvement entre lame et lamelle au grossissement 10, 25 et 40 (Gabli *et al.*, 2005).

- **Comptage avec le Fossomatic (Méthode Fluoro-opto-Electronique)**

Appelé aussi comptage automatique à Fluorescence, ce comptage utilise le fossomatic qui est un microscope automatique à fluorescence. Les noyaux des cellules du lait sont rendus fluorescents par un colorant, le bromure d'éthidium, qui se fixe sur l'ADN (Durel *et al.*, 2004).

Après coloration, le lait est étalé sous forme d'un film très fin de 10 microns d'épaisseur sur le pourtour d'un disque rotatif qui sert de porte objet pour le microscope. Chaque noyau de cellule somatique contenu dans le lait, excite la lumière d'une lampe au Xénon, renvoie une lumière rouge qui est captée par le microscope lorsque le noyau passe sous l'objectif. Ces émissions de lumière sont transformées en signaux électriques qui sont comptabilisés.

Les bactéries ont un ADN plus diffus qui émet une lumière moins intense. L'appareil est calibré pour ne pas enregistrer ces signaux de plus faible intensité (Serieys, 1985b). Ce système permet l'analyse de 180 prélèvements par heure qui au préalable doivent être homogénéisés par agitation (Hanzen, 2009).

- **Comptage avec le Coulter-Counter**

Le Coulter-Counter totalise les impulsions électriques qui résultent du passage de particules à travers un orifice situé entre deux électrodes. Quand une particule passe par l'ouverture, la résistance entre les deux électrodes est modifiée, produisant une impulsion électrique proportionnelle au volume de la particule (Durel *et al.*, 2004). L'appareil est calibré pour dénombrer les cellules qui ont un diamètre supérieur à une valeur minimale fixée (> à 5 microns). Pour rappel, les polynucléaires ont un diamètre de 12 à 15 microns, les macrophages de 25 microns et les lymphocytes de 6 à 15 microns (Serieys, 1985b ; Leray, 1999). Ce système suppose au préalable le traitement du lait pendant 16 à 26 heures au moyen de formaldéhyde pour permettre aux cellules de résister à l'action d'un agent tensio-actif qui va dissoudre la matière grasse du lait. Le système permet d'analyser 80 échantillons par heure (Hanzen, 2009).

#### **A- 2- 2- Test de Schalm (California Mastitis Test = CMT)**

Ce test développé par Schalm et Noorlander en 1957 s'adresse essentiellement à la détection des mammites subcliniques directement dans l'étable. Le California Mastitis Test encore appelé test de Schalm est le test le plus pratique et le plus répandu dans le monde. Il s'agit d'un test semi-quantitatif basé lui aussi sur la teneur du lait en cellules somatiques (Bouaziz, 2005). Ce test est réalisé en ajoutant au lait un détergent qui provoque une réaction de gélification du mélange dans le cas d'un lait mammiteux.

- **Principe du test**

Le principe théorique du CMT repose sur le phénomène de la lyse des cellules somatiques lorsqu'elles sont exposées à un détergent. Whyte *et al.*, (2005) expliquent que, une fois l'ADN et les histones exposés, le gel se forme par liaisons ioniques entre les histones chargées positivement et les têtes de molécules détergentes chargées négativement, ainsi que par la liaison entre elles des queues hydrophobes des molécules détergentes. La viscosité du complexe obtenu étant proportionnelle à la quantité de matériel nucléaire libéré, elle peut être corrélée au comptage des cellules somatiques (CCS) (Viguié *et al.*, 2009).

- **Réalisation du test**

Le test est réalisable à l'étable notamment sur le lait des quartiers juste avant la traite. Après élimination des premiers jets, un peu de lait (2ml environ) est recueilli dans une

coupelle transparente (chaque coupelle correspond à un quartier) et additionné d'une quantité à peu près égale de réactif. Après agitation de quelques secondes du plateau pour bien mélanger réactif et lait, la lecture est effectuée en observant par transparence l'aspect du précipité (Perrin-Couilloud, 1992). L'interprétation est donnée dans le tableau N° 3.

**Tableau N° 3: Grille d'interprétation du California Mastitis Test (CMT) (RCRMB, 2010 ; Guyot *et al.*, 2014).**

Grades	Description	Écoulement	Interprétation (cellules x10 <sup>3</sup> /mL)
<b>Négatif</b>	Mélange liquide sans précipitation	La cellule se vide au goutte à goutte	<b>0 – 200</b>
<b>Traces</b>	Le mélange devient légèrement visqueux et la viscosité a tendance à disparaître après ± 10 secondes.	La cellule se vide au goutte à goutte	<b>150 - 500</b>
<b>1</b>	Le mélange devient visqueux sans formation de gel au centre et la viscosité persiste.	Le mélange quoique épaissi se vide graduellement	<b>500 – 1.000</b>
<b>2</b>	Epaississement immédiat avec début de gélification et adhérence au fond en filaments visqueux.	La masse gélatineuse qui tombe au début laisse une certaine quantité de liquide dans la cellule	<b>800 – 5.000</b>
<b>3</b>	Formation d'un gel épais (blanc d'œuf) au centre de la coupe. Il n'y a pas d'évidence de liquide dans la cellule.	La masse gélatineuse tombe en un seul coup et ne laisse aucun liquide dans la coupe	<b>&gt; 5.000</b>

#### ***B- Corrélation entre comptages cellulaires et bactériologie***

Il y a parfois des décalages entre le moment où la bactérie en cause est présente dans la mamelle et le moment où les CCS augmentent, puis reviennent à la normale une fois l'infection résolue. Certains auteurs ont d'ailleurs montré qu'après inoculation chez certaines vaches, on avait bien une augmentation des CCS, alors que le comptage bactérien était nul au moment de l'analyse (Rivas *et al.*, 2001).

Il n'y a pas de relation linéaire entre la bactériologie et la valeur des CCS lors d'une infection. La cinétique des comptages cellulaires est de type sinusoïdale, concomitante mais asynchrone de l'excrétion bactérienne. On peut donc avoir un dénombrement bactérien faible avec des CCS élevées et inversement, pouvant être à l'origine de discordances apparentes de résultats. Ainsi, il est tout à fait possible d'avoir une vache avec un dénombrement bactérien important et des CCS normaux (en début d'infection par exemple) et inversement (en fin d'infection) (Muldoon et Liska, 1971).



## **I. 4. Importance**

### **I. 4. 1. Importance économique**

Les mammites constituent le trouble sanitaire le plus fréquent et aux plus fortes répercussions économiques en élevage bovins laitiers (Poutrel, 1985 ; Seegers *et al.*, 1997). Ces répercussions sont liées aux réductions de production laitière, au lait non commercialisé, aux pénalités sur le prix de vente ainsi que la baisse de la synthèse de la caséine qui pénalise le rendement des fabrications fromagères, le passage accru dans le lait de protéines d'origine sanguine (immunoglobulines, sérumalbumine), réduit la stabilité du lait lors des traitements thermiques, augmentation de la protéolyse par la plasmine qui réduit la stabilité lors de stockage de certains produits comme le lait (Coullioud *et al.*, 1991; Messadi *et al.*, 1991 ; Hartheiser, 1994 ; Seegers *et al.*, 1997 ; Fabre *et al.*, 1999 ; Seegers *et al.*, 1999 ; Faroult, 2000 ; Mamache *et al.*, 2011 ; Mamache *et al.*, 2014).

Par ailleurs, les infections laissent quelquefois des séquelles irréversibles qui se traduisent notamment par l'improductivité des quartiers atteints et conduisent à des réformes prématurées (Seegers *et al.*, 1997 ; Faroult, 2000 ).

La mammite subclinique est encore plus coûteuse car elle s'installe, de façon plus silencieuse, avec des risques élevés de contamination et des pertes importantes liées aux altérations quantitatives et qualitatives de la production laitière.

L'impact économique est lié aussi aux coûts des actions de traitement, de prophylaxie et de diagnostics (dépistage à l'aide de numération cellulaire et analyse bactériologique) (Faroult, 1994 ; Coulon et Lescourret, 1997 ; Seegers *et al.*, 1997 ; Fabre *et al.*, 1999 ; Seegers *et al.*, 2003 ; Mamache *et al.*, 2011).

### **I. 4. 2. Importance hygiénique (incidence sur la santé humaine)**

Les mammites portent atteinte à l'hygiène animale et potentiellement à la santé publique. Le risque zoonotique lié à la contamination du lait par certains germes fait l'objet de préoccupations de santé publique (Bradley, 2002 ; Seegers *et al.*, 1997).

En effet, le lait cru est fréquemment contaminé par des souches appartenant à plusieurs biotypes qui peuvent se trouver simultanément dans le lait. Un certain nombre d'entre elles sont capables de produire des entérotoxines et des infections. En absence de pasteurisation, ces souches pathogènes pour l'homme provenant de quartiers infectés peuvent contaminer les produits laitiers (Bradley, 2002 ; Seegers *et al.*, 1997 ; Mamache *et al.*, 2011).

Certaines souches sont très étudiées :

- Quelques souches de *Staphylococcus aureus* produisent des entérotoxines thermostables pouvant entraîner des toxi-infections alimentaires (nausées, vomissements et diarrhées) (Perrin Couilloud, 1992 ; Debuyser et Lapeyre, 1994).
- *Listéria monocytogenes* peut provoquer la listériose, maladie relativement rare mais mortelle pour l'homme (Sanaa et Menard, 1994).
- *E. coli* et *Campylobacter jejuni* sont responsables des troubles digestifs (Bastien, 1994 ; Seegers *et al.*, 1997).
- *Cryptococcus neoformans* provoque la cryptococcose chez l'homme (Perrin Couilloud, 1992).
- *Streptococcus agalactie* a été retrouvé comme cause d'infection chez l'homme, dans des cas d'endocardite et de méningite (Perrin-Couilloud, 1992).
- L'homme peut être infecté par la brucellose, la tuberculose et la fièvre Q lors de consommation de lait cru (Perrin-Couilloud, 1992).

Par conséquent, pour produire un lait sain, la vache doit rester saine et la solution réside, malheureusement parfois, en une antibiothérapie qui n'est pas sans danger. Notons que la pénicilline et ses dérivés sont largement utilisés dans le traitement des mammites et peuvent de ce fait contaminer le lait. En effet, hormis l'interférence dans la transformation de certains produits laitiers, les résidus d'antibiotiques dans le lait sont potentiellement néfastes pour la santé humaine. Leur présence dans le lait constitue un risque toxicologique pour le consommateur, notamment en ce qui concerne les pénicillines (allergies, foetotoxicité, souches résistantes, etc.). C'est le cas des résidus de Pénicilline qui peuvent entraîner des réactions cutanées chez des personnes suite à des réactions allergiques (Lebret *et al.*, 1990). Mais ces dernières peuvent être évitées en respectant les délais d'attente.



## CHAPITRE II : LE LAIT

### II. 1. Définition

Selon la réglementation Algérienne, la dénomination « lait » est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenue par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction et n'ayant pas été soumis au traitement thermique (AIM du 18 août 1993, N° JORA : 069 du 27-10-1993).

La dénomination « lait » sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache.

- Tout lait provenance d'une femelle laitière, autre que le lait de vache, doit être désigné par la dénomination « lait » suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient.
- Le lait destiné à la consommation ou à la fabrication d'un produit laitier, doit provenir de femelles laitières en parfait état sanitaire (AIM du 18 août 1993, N° JORA : 069 du 27-10-1993).

Selon le Dictionnaire Médical (2009), le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires après l'accouchement, qui constitue le premier aliment du nouveau-né ou des jeunes animaux. Il contient de la caséine, du lactose, des graisses, des sels et de l'eau en proportions différentes, selon l'espèce animale.

Selon la définition établie par le congrès international de la répression des fraudes alimentaires à Genève (1908) « Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir du colostrum » (Debry, 2006).

### II. 2. Composition et caractéristiques physicochimiques

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en  $\beta$ -carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur faible mais identifiable. C'est un liquide légèrement visqueux dont la composition et les caractéristiques physicochimiques varient sensiblement selon les espèces animales et selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation ainsi qu'au cours de la traite (Courtet-Leymarios, 2010).

Aliment complet, le lait est une émulsion de matières grasses dans un sérum aqueux qui contient en suspension des protéines et en solution des glucides, des minéraux, des vitamines et des enzymes. La composition chimique du lait de vache est présentée dans le tableau N° 4.

**Tableau N° 4: Composition du lait de vache (Alais et Linden, 2004).**

Eléments	Composition (g/l)	Etat physique des composants
<b>Eau</b>	<b>905</b>	Eau libre (solvant) + eau liée : 3,7%
<b>Glucides : lactose</b>	<b>49</b>	Solution
<b>Lipides :</b>	<b>35</b>	Emulsion de globules gras (3 à 5µm)
- matières grasses proprement dite	34	
- lécithine (phospholipides)	0,5	
- partie insaponifiable (stérols, carotènes, tocophénol)	0,5	
<b>Protides :</b>	<b>34</b>	Suspension micellaire de phospho-caséinate de calcium (0,08 à 0,12µm)
- caséines	27	Solution colloïdale
- protides solubles (globuline, albumines)	5,5	
- substances azotées non protéiques	1,5	
<b>Sels :</b>	<b>9</b>	Solution ou état colloïdal
- acide citrique	2	
- acide phosphorique	2,6	
- acide chlorhydrique	1,7	
<b>Constituants divers :</b> (vitamines, Enzymes gaz dissous)	<b>Traces</b>	
<b>Extrait sec total</b>	<b>127</b>	
<b>Extrait sec non gras</b>	<b>92</b>	

Les propriétés physico-chimiques du lait sont plus ou moins stables ; elles dépendent soit de l'ensemble des constitutions comme la densité, soit des substances en solution comme le point de congélation ou encore des concentrations en ions comme le pH (acidité).

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique ou la densité, le point de congélation, le point d'ébullition et l'acidité (Vignola, 2002). Ceci se résume comme suit :

- La densité du lait varie entre 1,028 et 1,035 pour une moyenne de 1,032 à 15°C.
- Le point de congélation peut varier de – 0,530°C à – 0,575°C avec une moyenne de – 0,555°C. Un point de congélation supérieur à – 0,530°C permet de soupçonner une addition d'eau au lait (la vérification se fait à l'aide d'un cryoscope).
- Le point d'ébullition est à 100,5°C.
- L'acidité est de 15 à 17 °D dans des conditions normales.

L'acidité est mesurée en degré Dornic (°D), 1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait.

### II. 3. Microorganismes du lait cru

Le lait prélevé dans de bonnes conditions d'hygiène à partir d'un animal sain contient peu de microorganismes (moins de  $10^3$  germes/ml), mais il est tout de suite contaminé par une multitude de germes. Il constitue un écosystème favorable pour le développement des microorganismes. Certains d'entre eux sont utiles, d'autres sont pathogènes pour l'animal et l'homme et d'autres sont responsables d'altération de la qualité sensorielle, organoleptique et nutritionnelle du lait. Les microorganismes du lait sont subdivisés en deux catégories : la flore du lait et les microorganismes de contamination. Ces derniers sont subdivisés en deux catégories: les agents d'altération et les agents pathogènes (Boubendir, 2012).

#### II. 3. 1. La flore du lait

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de  $10^3$  germes/ml). Il s'agit de germes essentiellement saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques mais aussi streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Le lait est protégé par des substances inhibitrices appelées « lacténines » mais, leur action est de courte durée (1 heure environ) (Guiraud, 1998).

#### III. 3. 2. Microorganismes de contamination

Selon Guiraud (1998), le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses :

- Fèces et téguments de l'animal : coliformes, entérocoques, *Clostridium*, éventuellement Entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), etc.
- Sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques, etc.
- Litières et aliments : flore banale variée, en particulier lactobacilles, *Clostridium* butyrique (ensilage).
- Air et eau : flores diverses dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées, etc.
- Equipement de traite et de stockage du lait : microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, streptocoques (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*), *Leuconostoc*, etc.
- Manipulateurs : staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations, de contamination fécale, etc.
- Vecteurs divers (insectes en particulier) : flore de contamination fécale.

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade; ils sont généralement pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire. Il peut s'agir d'agents de mammites : streptocoques pyogènes, corynébactéries pyogènes, staphylocoques,

etc. Il peut s'agir de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en absence d'anomalies du pis : *Salmonella*, *Brucella* et exceptionnellement *L. monocytogenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus anthracis*, *Coxiella burnettii* et quelques virus (Guiraud, 1998).

#### **II. 4. Place du lait dans la consommation alimentaire algérienne**

Le lait a une valeur importante dans la consommation alimentaire algérienne, vu sa richesse en éléments nutritifs, le lait représente 65,5% des protéines animales, supérieure à celles de la viande 22,4% et les œufs 12,1%, ainsi un gramme de protéine obtenu à partir du lait, coûte huit fois moins cher que la même quantité obtenue de la viande (Amellal, 1995), ce qui favorise l'augmentation de la consommation qui est jugée de 110 kg/an (Ferrah, 2000 ; Dilmi, 2008). L'évolution de cette consommation a bondi de 90 litres à 115 litres (Bourbouze, 2001), cette forte consommation est plus élevée que celle de la Tunisie qui est de 80 kg (Khaldi et Naili, 2001) et celle du Maroc 32 kg (Arraba *et al.*, 2001), elle reste très éloignée de celle de la France où elle est estimée de 400 L/habitant/an (Boumghar, 2000).

Le lait cru est un produit hautement nutritif. Cependant sa production doit être sévèrement contrôlée en raison des risques éventuels qu'il peut présenter pour la santé humaine (Labioui *et al.*, 2009). Le lait, qu'il soit cru ou traité est un excellent milieu de culture pour plusieurs microorganismes avec pour résultante l'altération du produit ou les infections/intoxications chez les consommateurs (Murinda *et al.*, 2004 ; Oliver *et al.*, 2005).

Indépendamment de la rareté des maladies infectieuses transmises par les aliments associées au lait cru, la menace pour la santé humaine de l'ingestion du lait non pasteurisé ou des produits laitiers ne devrait pas être sous-estimée.

Le lait et les produits laitiers de vache, de brebis ou de chèvre constituent une importante source d'infection pour l'homme. Le lait cru ou non pasteurisé peut contenir des bactéries comme *Brucella* et *Listeria* qui peuvent causer des maladies d'origine alimentaire et entraîner de graves problèmes de santé tels que la Brucellose et la Listériose.

## CHAPITRE III : LA BRUCELLOSE, UNE ZOONOSE MAJEURE

### III. 1. Historique

La brucellose a des racines historiques lointaines que nous n'aurons sans doute jamais fini d'explorer. Ainsi, des recherches paléontologiques suggèrent qu'en Afrique, un australopithèque, dont le squelette est vieux de plus de deux millions d'années, était déjà atteint d'une déformation vertébrale brucellique (D'anastasio *et al.*, 2011). Avant le début de l'antiquité, la brucellose infectait des êtres humains en Égypte, en Jordanie et en Palestine. L'expansion de la maladie dans ces pays semble coïncider avec l'apparition de la domestication des moutons et des chèvres (D'anastasio *et al.*, 2011 ; Moreno, 2014).

À Herculaneum et Pompéi, villes romaines qui furent recouvertes par une gangue volcanique suite à l'éruption du Vésuve en 79 après J-C., l'analyse des restes d'un fromage a permis d'observer (au microscope électronique à balayage) de probables traces de *Brucella*. Des fouilles ont révélé que sur une ancienne plage d'Herculaneum, environ 17% des squelettes retrouvés présentaient des signes de brucellose osseuse (spondylite brucellienne) (Capasso, 2002 ; D'anastasio *et al.*, 2011). L'analyse d'ADN d'ossements démontre qu'au moyen âge, la brucellose touchait des humains en Albanie, en Espagne et en Norvège.

L'Amérique était *a priori* indemne de brucellose au moins jusqu'en 1492 ; et c'est vraisemblablement l'introduction d'animaux provenant d'Europe qui est à l'origine de l'apparition de la brucellose sur le continent outre-Atlantique (Moreno, 2014).

La première description clinique de la maladie a été publiée par Allen Jeffery Martson en 1859 sous le nom de fièvre méditerranéenne (Roux, 1989) et présentait la maladie comme fébrile et ondulante. Mais, l'agent causal de la Brucellose, "*Micrococcus melitensis*" (*Brucella melitensis*), a été découvert en 1887 par le chirurgien britannique, le capitaine David Bruce, sa femme Mary Elizabeth Steele et le docteur microbiologiste Maltais Giuseppe Caruana-Scicluna à partir des rates de soldats décédés à l'île méditerranéenne de Malte (Wyatt, 2009).

En 1897, Bernhard Bang, un vétérinaire danois, isole un bacille de produits d'avortements bovins qu'il appella *Bacillus abortus* (*Brucella abortus*) (Bang, 1897) ; et Wright met au point le premier test diagnostique sérologique qui porte son nom : Réaction d'agglutination de Wright.

En 1905, Fioravanti Temistocle Archimede Lorenzo Giuseppe Sammut, mieux connu par Themistocles Zammit, un bactériologiste maltais, est le premier à comprendre, d'une part,

que la chèvre est un réservoir de *Micrococcus melitensis* ; d'autre part, que cette bactérie peut se transmettre de la chèvre à l'homme par la consommation de lait. Le caractère zoonotique de la brucellose est ainsi mis en lumière (Wyatt, 2005 ; Wyatt, 2011).

En 1914, Traum isole une bactérie semblable à celle isolée par Bang, à partir de fœtus porcine et la nomme *Bacillus abortus suis* (Traum, 1914). Quatre ans plus tard, une bactériologiste américaine, Alice Catherine Evans, met en lien *B. melitensis* et *B. abortus*, et propose la création du genre *Brucella* en l'honneur des travaux de David Bruce (Maurin, 2007 ; Maurin et Brion, 2009), et propose la pasteurisation du lait comme une mesure préventive (Evans, 1918). C'est ainsi que le genre *Brucella* est établi par Louis Meyer et Wilbur Shaw en 1920 en l'honneur de David Bruce (Meyer et Shaw, 1920).

En 1929, Huddleson développe des méthodes bactériologiques permettant de distinguer les espèces *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis*.

En 1930, aux Etats Unis, Buck démontre le pouvoir protecteur de la souche non virulente *Brucella abortus* S19 sur des bovins qui sera plus tard utilisée comme vaccin pour prévenir la brucellose bovine (Schurig *et al.*, 2002). En 1932, Wilson et Miles affirment la présence d'antigènes de structure lipopolycaridique chez *Brucella*, appelés A et M et inégalement répartis selon les espèces.

La souche *B. abortus* 45/20 est testée pour la première fois comme vaccin en 1938 par Mc Ewen et Priestley ; les travaux cumulés de Edwards et collaborateurs et de Taylor et collaborateurs, en 1945 et 1949 en font la première souche vaccinale inactivée mise au point (Schurig *et al.*, 2002). La première souche vaccinale vivante atténuée, *B. melitensis* Rev1, est développée par Elberg et Faunce en 1957 (Schurig *et al.*, 2002).

En 1953, Buddle et Boyes identifient en Australie et en Nouvelle Zélande *B. ovis* comme agent responsable d'épididymite chez les ovins (Nicoletti, 2002).

La souche *B. neotomae* est isolée en 1957 par Stoenner et Lockman chez des rongeurs du désert (*Neotoma lepida*) dans l'Utah aux USA (Maurin, 2005). *B. canis* est reconnue en 1966 par Carmichael et Bruner comme agent responsable d'avortements chez les canidés.

Pour la première fois en 1994, l'avortement d'un dauphin en captivité en Californie est attribué à une infection à *Brucella* (Ewalt *et al.*, 1994). Depuis, de nouvelles souches ont été isolées de divers mammifères marins : dauphins, marsouins et phoques (Foster *et al.*, 2002). Les espèces *B. ceti* (cétacé) et *B. pinnipedialis* (pinnipèdes) sont alors proposées (Foster *et al.*, 2007). L'espèce *B. microti* est isolée du campagnol (*microtus arvalis*) en république tchèque et proposée en 2008 (Hubalek *et al.*, 2007 ; Scholz *et al.*, 2008). Enfin, l'espèce *B. inopinata* est isolée et caractérisée en 2009 aux Etats- Unis (Scholz *et al.*, 2010).



















### III. 2. Définition et étiologie

D'une façon générale, la brucellose ou fièvre de Malte ou Mélicitococcie est une maladie réputée contagieuse et classée sur la liste unique des maladies animales graves de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE, 2009). Cette maladie infectieuse, contagieuse et transmissible, se manifeste habituellement chez les animaux, sur le plan clinique, par des avortements d'où le nom d'avortement épizootique.

La brucellose est due à une bactérie du genre *Brucella* qui est un coccobacille de petite taille : 0,5-0,7 µm x 0,6 - 1,5 µm (Banai et Corbel, 2010); Ce sont des bactéries Gram négatives, aérobie, non sporulées, non mobiles et non-capsulées (Bargen *et al.*, 2012). Les bactéries du genre *Brucella* sont des bactéries intracellulaires facultatives et sont capables d'infecter beaucoup d'espèces de mammifères à travers le monde (Banai et Corbel, 2010 ; Markey *et al.*, 2013).

Les bactéries du genre *Brucella* appartiennent à la famille des *Brucellaceae*, à l'ordre des *Rhizobiales* et à la classe des  $\alpha 2$ -*Proteobacteria* (Markey *et al.*, 2013).

A ce jour, douze différentes espèces de *Brucella* ont été décrites (Whatmore *et al.*, 2014 ; Scholz *et al.*, 2016 ). Chaque espèce de *Brucella* peut infecter différentes espèces d'hôtes, mais chaque espèce de *Brucella* a ses espèces hôtes préférentiels (figure N° 1) : *Brucella melitensis* (ovins et caprins), *Brucella abortus* (bovins), *Brucella suis* (suidés), *Brucella ovis* (moutons), *Brucella canis* (chiens), *Brucella microti* (rongeurs - *Microtus arvalis*), *Brucella neotomae* (Rongeurs - *Neotoma lepida*), *Brucella pinnipedialis* (pinnipèdes), *Brucella ceti* (cétacés), et *Brucella inopinata* (originellement isolé chez un patient humain, mais son hôte préférentiel n'est pas connu) (Xavier *et al.*, 2009 ; Scholz *et al.*, 2010 ; De Jong et Tsolis, 2012). Les deux espèces les plus récemment décrites sont *B. papionis*, qu'a été isolée de deux babouins avec rétention placentaire (Whatmore *et al.*, 2014), et *Brucella vulpis* qu'a été isolée à partir des nœuds lymphatiques mandibulaires de deux renards rouges en Autriche (Scholz *et al.*, 2016 ).

Species	Biovars	Preferred natural host	Main geographical area	Pathogenicity for man
<i>B. melitensis</i>	1, 2, 3	Sheep, Goats Wild ungulates 	Mediterranean countries Middle & Near East	High
<i>B. abortus</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, (7), 9	Bovines Wild ungulates 	Europe, Americas, Africa, Asia	Moderate
<i>B. suis</i>	1	Suids 	Americas, Asia, Oceania	High
	2	Suids, Hares 	Central & Western Europe	Very low
	3	Suids 	USA, China	High
	4	Reindeer 	USA, Canada, Russia	Moderate
	5	Wild rodents 	Russia	High
<i>B. neotomae</i>		Desert wood rat <i>Neotoma lepida</i> 	USA	Unknown
<i>B. ovis</i>		Sheep (males) 	Mediterranean countries	No
<i>B. canis</i>		Dogs 	USA, South America Central/Eastern Europe	Low
<i>B. ceti</i>		Cetaceans 	-	High / Unknown
<i>B. pinnipedialis</i>		Pinnipeds 	-	High / Unknown
<i>B. microti</i>		Common vole 	Central Europe	Unknown
<i>B. inopinata</i>		Unknown 	USA / Oceania	Unknown
<i>B. papionis</i>		Unknown 	Unknown	Unknown
<i>B. vulpis</i>		Unknown 	Unknown	Unknown

**Figure N° 1 : Espèces et biovars de *Brucella* (Garin-Bastuji, 2014).**

La présence ou non de l'antigène O au sein du lipopolysaccharide (LPS) des *Brucella* définit respectivement deux phénotypes de colonies : lisses (S pour smooth) ou rugueuses (R pour rough) (Mancilla, 2016). Le phénotype S est associé à une virulence plus marquée, comme chez *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti* et *B. pinnipedialis* (Foster *et al.*, 2007 ; Guzman-Verri *et al.*, 2012). *Brucella ovis* et *Brucella canis*, en revanche, expriment naturellement un LPS tronqué de son antigène O, leur conférant un phénotype R et une virulence diminuée (Mancilla, 2016).

### III. 3. Importance

#### III. 3. 1. Importance économique

L'importance de la maladie varie selon les pays en fonction des mesures de lutte mises en œuvre pour son éradication, et des populations animales locales. La brucellose est responsable de pertes économiques importantes en élevage en raison de la stérilité, des avortements des animaux malades et de la baisse de production laitière du troupeau qu'elle provoque, elle a également de lourdes répercussions sur les échanges commerciaux (Bounaadja, 2010). Elle provoque également une hausse du taux de mortalité périnatale, de la mortalité chez les femelles, et une baisse des productions.

L'importance économique que revêt cette zoonose oblige l'Algérie à recourir aux programmes d'abattage-indemnisation par l'arrêté interministériel du 3 Chaâbane 1416



correspondant au 26 décembre 1995 fixant les mesures de prévention et de lutte spécifiques à la brucellose bovine.

### III. 3. 2. Importance hygiénique

La brucellose est une zoonose majeure de répartition mondiale. Par la fréquence et la gravité des cas humains contractés à partir de l'animal et des productions, on reconnaît deux populations à très haut risque : les bergers et leur famille d'une part, les ouvriers des abattoirs et les vétérinaires d'autre part. C'est la raison pour laquelle, elle est considérée comme une maladie professionnelle et une zoonose accidentelle. Ainsi, elle fait partie des maladies réputées contagieuses mentionnées sur la liste des vices rédhibitoires et sur la liste des maladies prioritaires de l'OIE. L'incidence mondiale de la maladie est estimée à 500.000 cas/an (OMS, 2004), soit une incidence humaine annuelle, en 2001, de 4 à  $5.10^5$  cas humains (Saegerman, 2007). Entre 2003 et 2004, des cas humains ont été recensés en Afrique notamment au Cameroun, en Ethiopie, au Kenya, au Nigéria, en Tanzanie, en Ouganda, au Burkina Faso, au Mali, au Congo, en Erythrée, en Namibie, au Swaziland (Bounaadja, 2010). En 2009, le nombre de nouveaux cas humains déclarés de brucellose dans le monde était de l'ordre de 500 000 (Calvet *et al.*, 2010).

Les brucelles sont ainsi classées parmi les pathogènes potentiels du bioterrorisme (Pappas *et al.*, 2006). En effet, l'inhalation par voie aérienne de dix à cent bactéries brucelliennes peut suffire à déclencher une infection chez un être humain (Mailles et Vaillant, 2007 ; Maurin, 2007). Ce qui explique en grande partie que les États-Unis assimilent cette bactérie à « un pathogène potentiellement utilisable à des fins de bioterrorisme » (Carus, 2001 ; Maurin, 2007). *Brucella* pourrait, de surcroît, être utilisée comme arme dans le cadre d'une guerre bactériologique. Des bombes contenant *B. suis* ont d'ailleurs été produites par l'US Air Force en 1955 (Maurin, 2007 ; Maurin et Brion, 2009). L'utilisation de souches résistantes aux antibiotiques pourrait augmenter la dangerosité de telles armes.

Le pouvoir infectieux de *Brucella* est l'un des plus élevés « du monde bactérien ». Cependant, « le pouvoir létal » de cette bactérie est beaucoup moins grand que celui de *Bacillus anthracis* ou que celui de *Francisella tularensis* (agents pathogènes respectivement à l'origine de la maladie du charbon et de la tularémie) (Cure *et al.*, 2004 ; Maurin, 2007). Trois nouveaux défis ont relancé récemment l'intérêt médical vétérinaire pour cette maladie: son expansion dans la faune sauvage, l'inefficacité des certains vaccins disponibles et la découverte d'un nouveau réservoir chez les mammifères marins dont l'impact est quasi inconnu (Maurin, 2005).

### III. 4. Epidémiologie

La brucellose humaine est généralement transmise par les animaux d'élevage et fait partie des zoonoses les plus répandues dans le monde. Les espèces les plus impliquées sont *Brucella abortus* et *B. melitensis* cette dernière étant responsable des cas les plus graves. La brucellose humaine est étroitement liée à l'infection animale, qui atteint surtout les ruminants (bovins, caprins, ovins) et les porcs (Bounaadja, 2010). Il n'y a donc pas de transmission interhumaine de la maladie.

L'incidence de la brucellose humaine est rapporté à 500.000 nouveau cas chaque année (Pappas *et al.*, 2006). Le nombre exact des cas humains est cru d'être très élevé car beaucoup de cas sont jamais diagnostiqués ou rapportés (Pappas *et al.*, 2006). Des données publiées récemment suggèrent que l'incidence de la brucellose humaine excède 800.000 cas par an avec 95% un niveau d'incertitude de 0,34 – 19,6 millions de cas (Kirk *et al.*, 2015). Près de 50% de ces cas sont estimés d'être causés par des aliments contaminés (Havelaar *et al.*, 2015). En outre, 40% des cas de brucellose sont estimés résulté en infection chronique et 10% des cas résulté en orchite de l'homme (Kirk *et al.*, 2015).

Cependant, son incidence et sa prévalence varient largement d'un pays à l'autre, entre les pays dits développés où la maladie est devenue rare grâce à la mise en œuvre de politiques d'assainissement des troupeaux, et ceux moins fortunés qui, en l'absence de programmes de lutte nationaux, recensent de nombreux cas humains et animaux. En France, le nombre de cas humains a fortement diminué depuis les années soixante-dix (plus de 800 cas déclarés en 1978 contre 44 en 2000) grâce à un programme intense de contrôle des brucelloses animales et à la généralisation de la pasteurisation du lait destiné à la consommation humaine. L'évolution de la situation sanitaire des filières d'élevage s'est accompagnée d'une forte diminution des risques pour la santé humaine, mais sans aboutir à la disparition totale des cas humains déclarés. (Mailles et Vaillant, 2007).

La région méditerranéenne est une zone très sensible aux zoonoses de par sa biodiversité, sa variabilité environnementale et climatique et de par les mouvements migratoires de l'Homme et des animaux. D'ailleurs, la brucellose, dite également fièvre méditerranéenne, fait partie des zoonoses les plus répandues dans cette région (tout comme la rage, l'échinococcose kystique, la leishmaniose et les infections alimentaires causées par exemple par certaines espèces de *Salmonella* ou *Escherichia Coli*) (Seimenis *et al.*, 2006). Pourtant dans certains pays méditerranéens, le nombre de cas rapportés est souvent sous-estimé par manque de sensibilisation des médecins.

En Algérie, il est estimé, en l'absence de dépistage systématique chez les personnes à risque, un taux de 23,14 cas pour 100 000 habitants pour la seule année 2007 (INSP, 2007). Par ailleurs, la brucellose sévit jusqu'à présent à l'état enzootique dans les cheptels bovins, ovins et caprins, même sous contrôle d'un programme de lutte pluriannuel, basé sur le dépistage et l'abattage des animaux positifs. Chez les bovins, le programme de lutte n'est appliqué que pour les cheptels agréés (identifiés), dont il est diagnostiqué 638 foyers brucelliques avec 1333 bovins positifs, orientés aux abattoirs dans le cadre de l'abattage sanitaire pour la seule année 2009 (DSV, 2010).

Ainsi, l'on devrait s'attendre alors, au moins, à une diminution de l'incidence de la maladie, dans les élevages soumis au dépistage (identifiés) par rapport aux cheptels non dépistés. Ayant passé en revue les données relatives à la brucellose chez les ouvriers des abattoirs et les vaches de réforme. L'exposition professionnelle (catégorie non précisée) à la brucellose est constatée chez 49% des patients brucelliques présentés au service des maladies infectieuses du CHU d'Oran, pendant la période allant de 2000 à 2007 (Boualem *et al.*, 2009). Par ailleurs, via une enquête réalisée à Annaba, Tourab *et al.* (1990) décèlent un taux d'infection de 6,5% chez les professionnels. Il est admis que la brucellose est une zoonose professionnelle, dont la transmission est favorisée par un défaut de sécurité et d'hygiène, la consommation de lait cru et des sous-produits laitiers non pasteurisés issus d'animaux contaminés, ainsi que par le contact étroit avec les animaux malades. Le tableau N° 5 montre la situation nationale de l'assainissement des bovins laitiers contre la Brucellose (de 2002 à 2007).

**Tableau N° 5 : Situation nationale de l'assainissement des bovins laitiers contre la Brucellose (de 2002 à 2007) (DSV, 2007).**

Année	Nombre de bovins dépistés (*)	Nombre de cas	Nombre de foyers
2002	92958	758	418
2003	89294	796	404
2004	112264	753	437
2005	144313	1275	764
2006	141985	1413	679
2007	146425	1158	559

(\*) Tests effectués aux laboratoires de l'INMV : EAT (Epreuve Antigène Tamponné) et FC (Fixation de Complément).

Tableau N° 6 : Prévalence rapportée de la brucellose bovine endémique dans certains pays (Rahman, 2015).

Pays	Taille échantillon (troupeau/ animal)	Niveau d'étude	Test utilisé	Prév troupeau (IC 95%)	Prév bovins (IC 95%)	Reference
Argentine	ND	National	BPAT, SAT, 2-ME, C-ELISA, FPA, CFT	12.4% (10.89–14.0)	2.10% (1.90– 2.40)	de la Sota <i>et al.</i> , 2005
Bresil	921/10170	Sub-national	RBT et 2-ME	15.9% (13.6-18.5)	2.32% (2.04-2.63)	Borba <i>et al.</i> , 2013
Georgie	5673	Sub-national	RBT		8.5% (7.8-9.3)	Mamishashvili <i>et al.</i> , 2013
Algérie	95/1032	Sub-national	RBT	26.3% (17.8-35.4)	8.2% (6.6-10.1)	Aggad et Boukraa, 2006
Cameroun	146/1377	Sub-national	C-ELISA	20.3% (4.2-77.6)	3.1% (1.8-4.4)	Scolamacchia <i>et al.</i> , 2010
Egypte	1966	National	RBT		4.98% (4.1-6.0)	Samaha <i>et al.</i> , 2008
Ethiopie	903/7196	National	RBT, CFT	20.4% (17.8-23.2)	4.3% (3.6-4.5)	Ibrahim <i>et al.</i> , 2010; Mekonnen <i>et al.</i> , 2010; Megersa <i>et al.</i> , 2011; Megersa <i>et al.</i> , 2012; Adugna <i>et al.</i> , 2013
Libye	42	Sub-national			42.1% (20.3-66.5)	Ahmed <i>et al.</i> , 2010
Niger		Sub-national	iELISA	14.9% (12.4-17.8)	3.2% (2.7-3.9)	Boukary <i>et al.</i> , 2013
Nigeria	271/4745	Sub-national	cELISA	77.5% (68.6-84.5)	26.3% (22.1-31.0)	Mai <i>et al.</i> , 2012
Zambie	179/2537	Sub-national	RBT, cELISA	56.4% (48.8-63.8)	16.3% (14.9-17.8)	Chimana <i>et al.</i> , 2010
Iran	600	Sub-national	RBT		3.7% (2.3-5.5)	Akbarmehr et Ghiyamirad, 2011
Jordanie	62/671	National	RBT, iELISA	25.8% (15.5-38.5)	10.1% (7.9-12.7)	Al-Majali <i>et al.</i> , 2009
Tadjikistan	443/904	Sub-national	iELISA	4.1% (2.1-6.3)	2.0% (1.2-3.1)	Lindahl <i>et al.</i> , 2014
Turquie	626	Sub-national	RBT		35.3% (31.6-39.2)	Sahin <i>et al.</i> , 2008
Inde	6813	Sub-national	iELISA		13.6% (12.8-14.4)	Trangadia <i>et al.</i> , 2010; Trangadia <i>et al.</i> , 2012; Jagapur <i>et al.</i> , 2013; Islam <i>et al.</i> , 2013
Pakistan	3699	Sub-national	RBT, iELISA, cELISA, PAT		14.1% (12.9-15.2)	Abubakar <i>et al.</i> , 2012; Iqbal <i>et al.</i> , 2013; Saleha <i>et al.</i> , 2014

**Légende:** IC : intervalle de confiance ; Prev Troupeau : Prévalence au niveau de troupeau ; Prev bovin : Prévalence au niveau des bovins ; RBT: Rose Bengal test; CFT: Complément Fixation Test; BPAT: Buffered Plate Agglutination Test (Test d'agglutination sur plaque tamponnée) ; SAT: Slow (Lent) Agglutination Test; 2-ME: 2-Mercaptoethanol Test; cELISA: Compétitive ELISA; FPA: Fluorescence Polarisation Assay (Test) ; PAT: Plate Agglutination Test; ND: not disponible.

### III. 5. Modes de contamination

La pénétration de la bactérie dans l'organisme humain peut s'effectuer par voie orale, cutanée, conjonctivale ou aérienne (figure N° 2) (Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Mailles et Vaillant, 2007 ; Maurin et Brion, 2009). *Brucella* peut survivre jusqu'à deux ans dans le milieu extérieur si les conditions lui sont favorables (température basse, absence de lumière), mais seulement quelques heures en l'absence de matrice organique et sous la lumière directe du soleil (Needham et Gwei-Djen, 2000). On distingue deux grands types de contamination : la contamination par contact direct avec un environnement souillé et la contamination par ingestion d'aliments (De Massis, 2005 ; Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Mailles et Vaillant, 2007 ; Rapp *et al.*, 2016).

\* **Contamination par contact direct** : Elle s'effectue de trois façons : 1°) par pénétration cutanée de la bactérie (excoriation) ; 2°) par la muqueuse digestive (manuportage) ; 3°) par voie aéroportée ou parfois conjonctivale (une simple projection de bactéries contenues dans des poussières peut suffire à générer une infection) (Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Mailles et Vaillant, 2007 ; Rapp *et al.*, 2016)

Suite à un avortement ou à une mise-bas, les produits issus du tractus génital des femelles (eaux fœtales, avorton, placenta, lochies) représentent la matière virulente essentielle, et sont très contaminants, beaucoup plus que l'urine ou les fèces (Mailles et Vaillant, 2007 ; Ganiere *et al.*, 2015 ; Laaberki, 2017). Des animaux peuvent être porteurs asymptomatiques et excréteurs de la bactérie (notamment les chèvres dont le lait peut être riche en brucelles) (Freycon, 2015).

\* **Contamination par ingestion d'aliments** : Elle est généralement provoquée par la consommation de lait cru contaminé, de lait non pasteurisé, de produits qui en sont dérivés ou de viande peu cuite (Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Mailles et Vaillant, 2007 ; Maurin, 2007 ; Rapp *et al.*, 2016).

20 à 60 % des vaches séropositives, sans symptôme de brucellose, éliminent la bactérie dans leur lait (parfois de façon intermittente). Après un avortement brucellique, ce taux s'élève à plus de 70 % (ANSES, 2012).

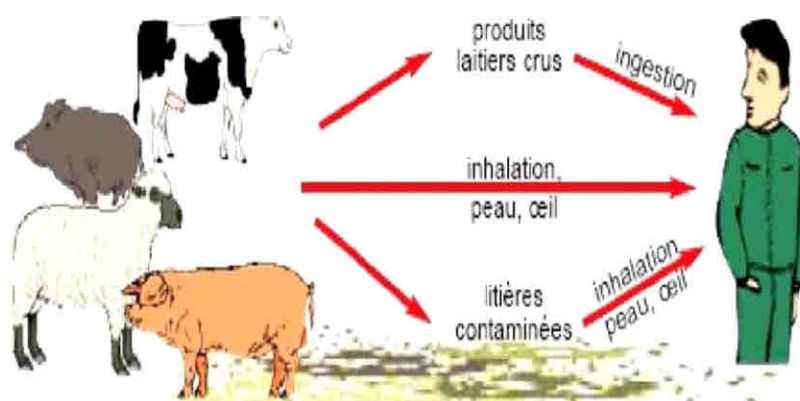
Chez les ruminants domestiques, la quantité de brucelles éliminées dans le lait d'une femelle contaminée est irrégulière. Certaines femelles séropositives excrètent jusqu'à  $10^6$  bactéries par millilitre de lait ; d'autres en excrètent « moins que le seuil de détection ». Le niveau d'excrétion semble plus faible chez les bovins que chez les petits ruminants (ovins et caprins) (ANSES, 2012).



Les bovins sont généralement contaminés par *Brucella abortus*, souche modérément pathogène pour l'homme, alors que les petits ruminants sont plus souvent infectés par *Brucella melitensis*, souche fortement pathogène pour l'homme. Pour cette raison, la consommation « accidentelle » de lait bovin contaminé peut être considérée comme moins dangereuse que l'ingestion de lait contaminé provenant d'ovins ou de caprins (ANSES, 2012). Toutefois, cette considération doit être relativisée étant donné que *Brucella melitensis* est parfois retrouvée dans du lait de vache (ANSES, 2012 ; Mailles *et al.*, 2012 ; ANSES, 2013).

L'excrétion de brucelles dans le lait s'accompagne fréquemment (mais pas systématiquement) de la présence d'anticorps dans le lait. La recherche de ces anticorps est très pratiquée chez les bovins, beaucoup moins chez les petits ruminants. La probabilité qu'une infection brucellique soit détectée est donc plus grande chez les bovins laitiers que chez les petits ruminants (ANSES, 2012). Pour mieux appréhender le risque de contamination humaine, il est important de noter que les éventuelles brucelles sécrétées dans le lait d'un animal sont souvent diluées, car mélangées aux laits des autres animaux.

En zone d'endémie, la contamination alimentaire est la plus répandue. Dans les pays officiellement indemnes de brucellose, comme la France, c'est la contamination par contact direct qui est la plus fréquente. Celle-ci se produit le plus souvent dans des laboratoires d'analyses, suite à la manipulation de prélèvements issus de personnes contaminées à l'étranger (Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Rapp *et al.*, 2016).



**Figure N° 2 : Mode de contamination de la brucellose humaine (Tabet-Derraz *et al.*, 2012)**

### III. 6. Pathogénie

*Brucella* est une bactérie intracellulaire facultative du système réticuloendothélial, elle se multiplie préférentiellement au sein des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules trophoblastiques du placenta (Martirosyan *et al.*, 2011). Sa virulence dépend grandement de la souche et de la dose d'inoculation. La pathogénie varie également selon

l'espèce hôte et l'individu (le statut reproducteur est prépondérant). En conséquence, tous les degrés d'atteinte intermédiaire sont observés sur le terrain, de l'absence de signes cliniques à l'infection aiguë et sévère.

Les *Brucella* possèdent un développement intracellulaire facultatif (Markey *et al.*, 2013). Elles ont mis en place des mécanismes de défenses leur permettant de contourner la réponse immunitaire de l'hôte (Poester *et al.*, 2013). L'infection peut se faire par les muqueuses respiratoires ou digestives. Les bactéries envahissent alors les cellules épithéliales comme les cellules M des plaques de Peyer (Poester *et al.*, 2013). Une fois dans l'organisme, elles peuvent survivre dans n'importe quelle cellule. Elles échappent à la phagocytose par les macrophages dans lesquels elles se multiplient sans provoquer leur destruction (Poester *et al.*, 2013). En effet, elles empêchent la fusion phagolysosomale et peuvent inhiber l'apoptose des macrophages et se diriger vers un compartiment du réticulum endoplasmique rugueux (RER) propice à la réplication des *Brucella* (Poester *et al.*, 2013). Les *Brucella*, notamment *B. abortus*, possèdent un fort tropisme pour les cellules trophoblastiques dans lesquelles elles se multiplient intensément (De Figueiredo *et al.*, 2015). L'érythritol, un alcool à quatre carbones présent naturellement dans les eaux fœtales des ruminants, serait une source privilégiée de carbone pour les *Brucella*, favorisant ainsi leur croissance au niveau de l'utérus (Poester *et al.*, 2013). Ces bactéries entraînent alors des ulcères de l'endomètre, des placentites et la destruction des villosités, causant la mort et l'expulsion du fœtus (De Figueiredo *et al.*, 2015).

Ces cocobacilles colonisent également les cotylédons, le chorion, les poumons du fœtus et les fluides fœtaux au cours du dernier tiers de gestation chez les ruminants. Le fœtus expulsé présente souvent des lésions de pleuropneumonie (De Figueiredo *et al.*, 2015).

L'internalisation des *Brucella* dans les cellules de l'organisme est possible grâce aux protéines bactériennes BvrR (*Brucella* virulence related regulatory protein) et BvrS (*Brucella* virulence related sensory protein) (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). Celles-ci permettent l'expression de protéines de la membrane externe qui facilitent l'internalisation des bactéries par modification du cytosquelette de la cellule hôte (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). L'invasion par la muqueuse digestive n'entraîne pas de réaction inflammatoire (Poester *et al.*, 2013). Les *Brucella* présentent des mécanismes inhibant l'activation du système immunitaire, la sécrétion des cytokines ainsi que la présentation des antigènes. Le LPS, malgré son activité endotoxinique relativement faible, joue un rôle important. Il prévient l'action du complément et permet une résistance contre les peptides antimicrobiens comme les défensines et les lactoferrines (Poester *et al.*, 2013). En effet, les *Brucella* possèdent une enveloppe hydrophobe constituée de nombreuses molécules peu chargées négativement (Martirosyan *et*

*al.*, 2011), les rendants insensibles aux peptides antimicrobiens cationiques de l'hôte. Les *Brucella* ne possèdent pas de capsule, de fimbriae ou d'exotoxines (Godfroid *et al.*, 2014). En revanche, le système de sécrétion de type IV codé par l'opéron *virB* est indispensable pour la survie des bactéries dans le milieu intracellulaire (Poester *et al.*, 2013). L'expression de l'opéron *virB* est activée en milieu acide (Carvalho-Nota *et al.*, 2010) et entraîne la neutralisation du pH du phagosome, permettant ainsi la survie des bactéries. Enfin, d'autres gènes sont exprimés afin d'empêcher la maturation et la fusion du phagosome avec le lysosome (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). Cette dernière est également empêchée par le glucane cyclique  $\beta$ -1,2, protéine de la membrane externe (Carvalho-Nota *et al.*, 2010). Les mécanismes de virulence des *Brucella* ne sont pas encore tous connus.

La réponse humorale est dirigée principalement contre l'antigène majeur de *Brucella*, à savoir la chaîne O de son lipopolysaccharide. Ces anticorps anti-LPS induisent une lyse bactérienne, par la voie classique du complément ainsi que par opsono-phagocytose. Une réponse se développe aussi contre des protéines de la membrane extérieure, du périplasma, et du cytoplasme, mais plus tardivement. Le LPS de *Brucella* possède une structure qui module la réponse immunitaire de l'hôte et confère une résistance aux activités antimicrobiennes et agit comme facteur de virulence pour la survie et la réplication intracellulaire (Lapaque *et al.*, 2005).

### III. 7. Aspects cliniques

#### III. 7. 1. Chez l'homme

La brucellose humaine se caractérise avant tout par une symptomatologie très protéiforme. Son incubation dure de deux semaines à cinq mois. Son tableau clinique est habituellement polymorphe d'où le sobriquet de « maladie aux cents visages ».

Néanmoins, les formes classiques de la brucellose humaine se traduisent souvent par une transpiration nocturne abondante à odeur caractéristique, une fièvre ondulante, des douleurs mobiles type myalgies et arthralgies et des symptômes nerveux. Dans sa forme chronique, le malade est apyrétique, asthénique avec souvent une atteinte ostéo-articulaire (Chakroun et Bouzouaia, 2007).

Des complications uro-génitales sont également possibles sous forme d'orchite, d'épididymite ou d'infections ovariennes. Comme chez l'animal, les brucelles peuvent induire des avortements chez la femme enceinte. Des atteintes viscérales ont été décrites dans la littérature (Chakroun et Bouzouaia, 2007).



La seule prévention contre ce passage à la chronicité sera la rapidité et la pertinence du traitement mis en place. Les brucelloses sont rarement à l'origine de décès (Dao *et al.*, 2009).

### III. 7. 2. Chez l'animal

La brucellose est essentiellement une maladie de la reproduction. Elle est caractérisée par l'atteinte de l'appareil génital, chez les femelles et les mâles, avec une stérilité possible dans les 2 cas. L'infection se traduit généralement par des avortements chez les femelles. Ils peuvent avoir lieu quelques semaines à plusieurs mois après l'infection. Chez les mâles, la localisation des *Brucella* est fréquente dans les testicules et les épидидymes ; des orchites ou orchite-épididymites sont observées, ainsi qu'une excrétion de la bactérie dans le sperme.

La transmission peut se faire directement par absorption d'un aliment contaminé ou par contact indirect avec un élément de l'environnement contaminé par les matières virulentes. Les sources principales de contamination chez les animaux sont surtout d'origine génitale à partir de l'avorton, du placenta ou des sécrétions génitales. Le lait, les selles et les aérosols que ces produits peuvent provoquer sont également des matières virulentes (Bounaadja, 2010).

### III. 8. Diagnostic

On distingue le diagnostic direct (qui consiste à identifier la bactérie *Brucella* ou ses constituants) du diagnostic indirect (qui consiste à identifier des anticorps anti-brucelliques). Ces tests de diagnostic sont cruciaux, car chez l'homme comme chez l'animal, le diagnostic clinique de la brucellose est souvent difficile.

#### III. 8. 1. Diagnostic clinique

On suspectera la brucellose au sein d'un cheptel en cas d'avortements tardifs avec rétention partielle ou totale du placenta, de stérilité ou de prolongation des intervalles de mises bas, d'arthrites, de mammites, d'orchites et d'échecs répétitifs à l'insémination artificielle (Ouedraogo, 2001). Le diagnostic différentiel de la brucellose repose sur les maladies abortives d'origine infectieuse (campylobactériose, salmonellose, fièvre Q, chlamydie, listériose, fièvre de la Vallée du Rift, etc.) ou d'origine parasitaire (toxoplasmose, etc.). Il repose également sur des maladies d'origine alimentaire ou traumatique (Dean *et al.*, 2013). C'est pourquoi, il est nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes qui utilisent surtout la bactériologie, et les marqueurs de l'infection (sérologie et allergologie).

### III. 8. 2. Diagnostic bactériologique

L'isolement de la bactérie vivante à partir de tissus ou de fluides biologiques reste la méthode de référence pour mettre en évidence avec certitude *Brucella* (Mailles et Vaillant, 2007 ; Maurin, 2007 ; Maurin et Brion, 2009).

En *brucellose humaine*, divers prélèvements correspondant à des sites de localisation de *Brucella* peuvent être mis en culture, tels que des prélèvements de la moelle osseuse, du liquide cébrospinal ou encore de pus ; mais la recherche de *Brucella* se fait essentiellement à partir du sang du patient (hémoculture).

En *brucellose animale*, les sécrétions vaginales, l'enveloppe fœtale lors d'avortement, le sperme, l'urine ou le lait représentent un bon matériel biologique de départ pour la recherche de *Brucella* sur des milieux de culture sélectifs. L'addition d'antibiotiques appropriés aux milieux de culture permet d'éliminer d'éventuels contaminants présents dans les prélèvements biologiques. L'incubation est faite à 37°C en absence ou en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

L'identification de l'espèce et du biovar des souches de *Brucella* mises en évidence est réalisée dans des laboratoires de référence. Cette étape d'identification est importante pour comprendre l'épidémiologie de la brucellose.

L'isolement et la caractérisation de l'agent pathogène présentent des inconvénients : la réalisation des manipulations est longue ; le pathogène doit être manipulé dans une zone confinée de type 3, par du personnel de laboratoire hautement qualifié ; de plus, la bactérie représente un risque pour le personnel de laboratoire de par le caractère zoonotique de la brucellose (Bounaadja, 2010).

Bien que le diagnostic de certitude reste le diagnostic bactériologique, les difficultés propres de sa mise en œuvre par un laboratoire de routine font de la sérologie, le recours le plus utilisé (Bounaadja, 2010).

### III. 8. 3. Diagnostic sérologique

Les réactions sérologiques utilisées dans le diagnostic de la brucellose sont nombreuses mais il existe une parenté antigénique avec d'autres germes comme *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* O9 et *Vibrio cholerae*, à l'origine de fausses réactions positives (Godfroid *et al.*, 2010).

La plupart de ces tests sont préparés à partir d'une suspension inactivée de *Brucella abortus*, et permettent de détecter principalement les anticorps dirigés contre le S-LPS (Maurin, 2007 ; Maurin et Brion, 2009). Si le sérum du patient contient des anticorps anti-brucelliques, ceux-ci réagissent avec l'antigène du test, et forment un agglutinat détectable

(Brock *et al.*, 2007). La technique de détection de l'agglutinat est variable d'un test à l'autre. Selon les laboratoires, l'antigène et la technique utilisés, il existe une grande variabilité dans la mesure des titres sérologiques (Maurin et Brion, 2009).

La vaccination peut être responsable de la formation d'anticorps de mêmes classes. L'épreuve sérologique idéale doit établir un diagnostic précoce, identifier les infectés chroniques et différencier les anticorps de vaccination de ceux d'infection (Serra et Viñas, 2004).

#### **a. Séro-agglutination de Wright (SAW)**

La séro-agglutination de Wright est une technique d'agglutination lente en tubes (OIE, 2008). La technique de séro-agglutination demeure la référence préconisée par l'OIE du fait de sa standardisation basée sur un sérum étalon international titré à 1000 UI (Maurin, 2007 ; Maurin et Brion, 2009).

La SAW met principalement en évidence les anticorps agglutinants de type IgM (plus accessoirement les IgG). Ce test se positive 7 à 15 jours après le début des signes cliniques, mais devient rapidement négatif en cas de guérison (Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Maurin et Brion, 2009).

Le degré d'agglutination obtenu avec un sérum est exprimé en UI par millilitre. Au-delà de 30 UI par ml, un sérum est considéré comme positif (OIE, 2005a). La persistance d'un titre d'anticorps supérieur ou égal à 100 UI un an après le début des symptômes peut être évocatrice d'un foyer bactérien profond. Des réactions faussement négatives peuvent être observées suite à une tularémie ou à une yersiniose (Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Maurin et Brion, 2009).

#### **b. Test de coloration au Rose Bengale (TRB) ou Epreuve de l'Antigène Tamponnée (EAT)**

Ce test est une réaction d'agglutination rapide sur lame, sensible et spécifique. Elle est réalisée au moyen d'une suspension bactérienne (souvent *B. abortus*) colorée au rose Bengale en milieu acide tamponné à pH 3,65 (Guzman-Verri *et al.*, 2012). Ce n'est pas une réaction quantitative, la positivité est exprimée en croix (de 1 à 4) (Janbon, 2000). Elle permet juste de détecter les immunoglobulines G.

Cette technique est prescrite pour le dépistage des troupeaux et des animaux individuels car réputée très spécifique (Sp >95%) et sensible (Se >90%) (OIE, 2008).

#### **c. Epreuve de l'anneau sur le lait ou Ring Test**

Le principe consiste à la mise en évidence des anticorps brucelliques dans le lait. Très efficace, l'épreuve de l'anneau sur le lait ou Ring test (RT) est un test facile à réaliser et

économique. Le RT peut être réalisé à grande fréquence (mensuelle) aussi bien pour le dépistage des troupeaux laitiers infectés que pour la surveillance ininterrompue des troupeaux assainis. Le Ring test est une réaction d'agglutination qualitative obtenue par interaction des anticorps contenus dans le lait dirigés contre le LPS bactérien avec un antigène coloré par l'hématoxyline. Les agglutinats colorés sont adsorbés sur les globules gras et se regroupent en surface dans l'anneau de crème. Le Ring Test sur lait de mélange, très utile chez les bovins, n'est pas utilisable chez les petits ruminants (Aulakh et *al.*, 2008).

#### **d. Test Fixation du Complément**

Le test de fixation du complément (FC) met en évidence, une fois liés à leur antigène, les anticorps (IgG1 et IgM) fixant le complément. Ce test quantitatif est très sensible (Bounaadja, 2010), très spécifique et est une technique très utilisée comme test de confirmation (Bula et *al.*, 1987).

#### **e. Épreuve de l'antigène Buffered Plate Agglutination (BPA)**

L'épreuve à l'antigène Buffered Plate Agglutination est une méthode rapide et facile utilisant un principe d'agglutination rapide sur lame en milieu acide tamponné (pH 3,7) ce qui permet d'éliminer les agglutinations non spécifiques (Hebano, 2013).

#### **f. Fluorescence Polarisation Assay ou Épreuve de polarisation de la fluorescence (épreuve de substitution pour les échanges internationaux)**

Le test de polarisation de la fluorescence (TPF) est une technique simple qui permet de mesurer l'interaction antigène-anticorps réalisable au laboratoire ou sur le terrain (Hebano, 2013).

#### **g. Méthode immuno-enzymatique : ELISA (Enzym Linked ImmunoSorbent Assay)**

L'ELISA indirect ou iELISA utilise comme antigène le LPS-S. En plus d'être automatisable, rapide, et performant, il est considéré comme le meilleur test de tamisage utilisé dans les programmes de suivi et de contrôle de la Brucellose (Percy et *al.*, 1998). Il permet de valider des résultats dans des conditions de contrôle de la qualité et se prête à l'analyse d'un nombre élevé d'échantillons de lait individuel ou de lait en vrac (Zinsstag, 2003). L'ELISA est sensible mais sa spécificité est plus faible que celles de l'épreuve de Rose Bengale et de fixation du complément. Il est incapable de différencier certains anticorps post vaccinaux (*B. abortus B19*) (Rivera et *al.*, 2003).

Quant-à l'ELISA de compétition, elle est plus spécifique et évite les réactions dues aux anticorps post-vaccinaux du vaccin B19.

Récemment, certains chercheurs ont mis au point une épreuve immuno-enzymatique à l'avidine-biotine (ELISA A-B). Elle est considérée comme une épreuve qui fait preuve de

robustesse et de performance en termes de spécificité et de sensibilité (98,8% et 98,2%) comparables à celles de l'épreuve ELISA indirect. De plus, son coût est inférieur à celui des trousses ELISA actuellement commercialisées (Renu-karadhya et *al.*, 2001).

#### h. Diagnostic allergique ou allergologique

Le diagnostic allergique permet de révéler un état d'hypersensibilité retardé car les *Brucella* possèdent un pouvoir allergique. Il est spécifique mais peu sensible, utilisable pour le dépistage des troupeaux non vaccinés, surtout chez les bovins de plus de 12 mois mais rarement chez les petits ruminants (Fensterbank, 1977).

L'épreuve cutanée allergique (ECA) se pratique, après repérage du lieu d'inoculation et mesure du pli cutané, par injection intradermique (ID) au milieu de l'encolure de 0,1mL de brucelline. Tout épaissement du pli cutané  $\geq 2$  mm constaté 72 heures après injection est considéré positif. Cette épreuve souffre d'erreurs par défaut (seuls 60 à 80% des bovins infectés réagissent) mais présente l'avantage d'être spécifique (spécificité de 100%) (Ganière et Dufour, 2009).

Les défauts de sensibilité ou de spécificité des méthodes sérologiques (tableau N° 7) nécessitent souvent l'association de plusieurs d'entre elles. Aucun de ces tests ne permet à lui seul de détecter à la fois les patients ou les animaux récemment infectés et ceux qui sont porteurs latents ou chroniques (Bounaadja, 2010).

Les tests au Rose Bengale et l'ELISA, complétés si besoin par la fixation du complément restent les épreuves standardisées les plus fiables et les plus utilisées aujourd'hui pour le dépistage de la brucellose (Bounaadja, 2010).

**Tableau N° 7 : Sensibilité et spécificité des différentes techniques de diagnostic sérologique (Lefevre et *al.*, 2003 ; Acha et Szyfres, 2005).**

Test	Sensibilité	Spécificité	Immuno globuline	Coût	Faisabilité
EAT	+++ selon situation épidémiologique	+++ +	IgM IgG1 IgG2	Faible	Facile : peut se faire sur le terrain
Ring Test	+++	++	IgG	Faible	Assez facile, mais selon la taille du troupeau
Séroagglutination de Wright	++	+	IgG2	Faible	Facile
FC	+++	++++	IgG1 IgG2	Elevé	Complicquée
BPA	+++	+++	IgG	Faible	Plus compliqué que EAT pour résultats équivalents
ELISA Indirecte	++++	+++	<b>IgG1</b> <b>IgG2</b>	Elevé	Difficile
ELISA de Compétition	+++	++++	<b>IgG1</b> <b>IgG2</b>	Elevé	Difficile
TPF	+++	++++		Moyen	Facile, faisable sur le terrain, mais nécessite du Matériel spécifique

### III. 8. 4. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire le plus utilisé est la PCR. La PCR ou Réaction en Chaîne par Polymérase est une technique qui permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN spécifique, appelé également **amplicon**, à partir de deux amorces situées de part et d'autre de ce fragment. Un cycle d'amplification est composé de 3 étapes : la dénaturation de l'ADN double brin, l'hybridation des amorces et une étape d'élongation.

La PCR est utilisée en paléontologie pour détecter d'infimes quantités d'ADN. C'est grâce à cette technique que des scientifiques ont identifié des fragments d'ADN de *Brucella* sur des ossements humains datant de plusieurs siècles (Moreno, 2014). Elle permet un diagnostic plus rapide que la mise en culture bactérienne, et a aussi l'avantage de présenter un plus faible risque de contamination pour les opérateurs, mais est plus coûteuse. En outre, les tests PCR sont ordinairement insuffisants pour identifier l'espèce de *Brucella* en cause (Chakroun et Bouzouaia, 2007 ; Maurin et Brion, 2009 ; Freycon, 2015). En fait, Le génome de *Brucella* est composé de deux chromosomes circulaires d'approximativement 2,1 et 1,2 Mpb sauf *B. suis* biovar 3 qui possède un seul chromosome (Markey *et al.*, 2013). Chaque cellule contiendrait environ 5 fg (fg = femtogramme,  $10^{-15}$  g) d'ADN (Queipo-Ortuño *et al.*, 2005), la présence de plasmide n'a jamais été décrite.

Les différentes espèces de *Brucella* sont phylogénétiquement proches puisque le pourcentage d'homologie est de 90% (Banai et Corbel, 2010 ; Markey *et al.*, 2013). Cette homologie rend plus difficile le développement de méthodes moléculaires pour l'identification spécifique de chaque espèce (Laflèche *et al.*, 2006).

Depuis quelques années, l'utilisation de la technique de PCR en temps réel dans le diagnostic de la brucellose se multiplie. Elle est réalisée à partir de différents échantillons : sang, lait, sécrétion nasale, rate, sperme, ganglions lymphatiques et fœtus avorté (Bounaadja, 2010).

La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un fluorochrome pendant l'amplification de la séquence cible, l'amplification est mesurée tout au long de la réaction. La fluorescence est donc proportionnelle à la quantité de produits d'amplification. Il existe 2 systèmes de détection quantitative des amplicons: la détection par **des agents intercalants** (l'intercalant le plus utilisé est le SYBR Green) et la détection par **des sondes fluorescentes**. Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales : l'hydrolyse de sondes (Taqman assay), l'hybridation de 2 sondes (HybProbes), les balises moléculaires (Molecular Beacons) et les amorces scorpion (Scorpion primers). Selon Wittwer *et al.*, (1997), ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité



équivalente. Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité (Bustin, 2000).

Les meilleures méthodes validées sont basées sur la détection des séquences spécifiques de *Brucella* spp., comme les gènes 16S-23S, la séquence d'insertion *IS711* ou le gène *bcs31* codant une protéine de 31-kDa (Baddour et Alkhalifa, 2008).

L'*IS711* est depuis longtemps considéré comme un bon marqueur du genre *Brucella* permettant également de discriminer les espèces de *Brucella* et leurs biovars en fonction de son nombre de copies et de sa répartition dans le génôme (Cloeckaert *et al.*, 2000).

### III. 9. Lutte contre la brucellose

Chaque cas de la brucellose humaine est directement ou indirectement lié avec des animaux infectés ou leurs produits. Donc, le contrôle de la brucellose humaine dépend en minimisant/contrôlant la charge de la maladie chez les animaux et la réduction de la transmission de l'animal à l'homme (Zinsstag *et al.*, 2007; Rubach *et al.*, 2013).

Le traitement de la brucellose animale n'est pas recommandé, et il est à éviter en raison de son coût onéreux, des risques d'apparition de résistance et de l'absence de garantie de blanchiment de l'animal traité (OIE, 2004). Par conséquent, les efforts doivent être plutôt dirigés vers le contrôle et l'éradication de la maladie (Shey Njila, 2005). En Général, la lutte repose sur le traitement thermique des aliments, la protection des professionnels à risque, la vaccination du bétail, l'élimination des animaux infectés et le contrôle des mouvements d'animaux (Adamou Harouna, 2014).

La lutte offensive repose sur le dépistage des animaux infectés, leur isolement et leur élimination rapide. La lutte défensive concerne surtout la surveillance de routine, le contrôle à l'introduction d'un animal et la protection d'un cheptel sain à la contamination de voisinage (Adamou Harouna, 2014). En effet, lorsque la prévalence de la maladie est élevée, l'éradication de tous les animaux infectés est quasi irréalisable. La priorité est donc d'immuniser un grand nombre d'individus contre l'infection ; ce qui, à terme, réduit l'incidence de la brucellose. Par contre, lorsque la prévalence de la maladie devient faible, l'éradication de tous les animaux infectés devient réalisable. La priorité n'est plus de vacciner la population, mais de détecter toutes les sources de contamination, puis de les maîtriser. Étant donné que la vaccination perturbe fortement le dépistage des animaux contaminés, le fait d'arrêter la vaccination permet une identification et une éradication plus rapides des sources infectieuses restantes ; ce qui peut conduire à la disparition de la brucellose sur un territoire (Jouan, 2016).

La source quasi exclusive de contamination humaine est animale. C'est pourquoi, la meilleure prévention de la brucellose humaine repose sur la pasteurisation qui est suffisante pour détruire la bactérie, et empêche la propagation de la maladie par le lait (Hars et *al.*, 2013).

#### \* La pasteurisation

S'appliquant au lait ou à d'autres liquides, la pasteurisation détruit, de façon certaine, un grand nombre de micro-organismes pathogènes dont *Brucella*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella* et *Staphylococcus*. De plus, la pasteurisation retarde la croissance des micro-organismes, et augmente la durée de conservation des produits (Brock et al., 2007).

L'efficacité de la pasteurisation sur la destruction de *Brucella* a été mise en évidence en 1921. Cette découverte a permis de réduire le risque de transmission de la maladie à l'homme par des moyens techniques relativement simples à mettre en œuvre. Dans les régions fortement touchées par la brucellose animale (Afrique, Moyen-Orient...), la pasteurisation du lait a un très fort impact sur l'épidémiologie humaine (Moreno, 2014).

La pasteurisation consiste à chauffer un produit au-dessus d'une certaine température durant un certain temps. Les techniques de pasteurisation ont progressivement évolué vers une baisse de la durée de chauffe et une élévation de la température. On parle de pasteurisation basse pour 30 minutes de chauffe à 63°C, de pasteurisation haute pour 5 à 20 secondes à 72°C/85°C, et de stérilisation lorsque la température atteint 140°C (Brock *et al.*, 2007).

Dans du lait, *Brucella abortus* ne résiste pas plus de 15 secondes à une température de 71 °C (contre 24 heures à 30 °C et 18 mois à 0 °C) (Mailles et Vaillant, 2007). Cependant, sans doute pour des raisons organoleptiques, la pasteurisation est contraire au cahier des charges de fabrication du fromage Reblochon (JORF, 2015).



## CHAPITRE IV : *Listeria monocytogenes*, AGENT PATHOGENE ZOONOTIQUE

### IV. 1. Historique

Le nom *Listeria* lui a été donné par Pirie en 1940 en l'honneur du chirurgien John Lister. La listériose est caractérisée par une élévation anormale du taux de monocytes d'où son nom de monocytoïdes (Kaismoune, 2009).

Hulphers, vétérinaire Suédois, fut le premier auteur à avoir décrit cette infection chez un lapin atteint de méningite en 1911 (El Mouhtadi, 2014).

La première observation de listériose humaine documentée remonte à 1918 lorsque Dumont et Cotoni ont isolé en France une bactérie du liquide céphalo-rachidien d'un soldat atteint d'une méningite. En 1929, au Danemark, une bactérie similaire a été isolée par Nyfeldt de trois malades atteints de mononucléose, décrite sous le nom de *Bacterium monocytogenes hominis* (Desneux, 2015).

En 1926 par Murray -Webb et Swann, lors d'une épizootie chez des lapins et des cobayes qui présentaient une mononucléose sanguine et des lésions de nécrose au niveau du foie. Ils lui donnèrent alors le nom de *Bacterium monocytogenes* (El Mouhtadi, 2014).

D'autres chercheurs isolèrent la même bactérie dans des circonstances différentes à partir de 1926, parmi lesquelles :

- Prie, chez la gerbille en Afrique, décrite sous le nom de *Listerella hepatolytica* en 1927.
- Burn, démontre le rôle de la bactérie dans l'infection périnatale en 1933 (Kaismoune, 2009).
- Sohier et al., ont mis en évidence, à partir d'un sang de bœuf cuit, une seule souche de *Listeria* qui se différencie de *L. monocytogenes* par la réduction des nitrates et l'ont décrite sous le nom de *L. denitrificans* en 1948.

Toutefois, cette dernière a été définitivement exclue du genre *Listeria* lors de la récente révision de la taxonomie. Cette bactérie corynéforme a été transférée dans le nouveau genre *Jonesia* dont elle constitue l'unique espèce (Rocourt *et al.*, 1987).

- A partir de 1951, Reiss, Potel et Krebs décrivent la forme septicémique du nouveau-né, et les travaux du Seeliger ont montré que *L. monocytogenes* joue un rôle assez important aussi bien en pathologie humaine qu'en pathologie animale (Boubendir, 2012).
- En 1960, les infections humaines à *Listeria* ont été diagnostiquées.
- En 1981, la première mise en évidence de la transmission alimentaire de la listériose humaine (Gillespie et Hawkey, 2006).

## IV. 2. Taxonomie

Le genre *Listeria* appartient au groupe des bactéries présentant un pourcentage G+C inférieur à 50%. Il comprend actuellement 17 espèces. Il est constitué de bactéries à Gram positif appartenant au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Listeriaceae* (Desneux, 2015).

Historiquement, la caractérisation génomique et moléculaire du genre *Listeria* a principalement porté sur le pathogène humain *L. monocytogenes* ainsi que sur un nombre restreint d'espèces génétiquement proches de *L. monocytogenes* : *L. ivanovii* (pathogène des animaux), *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*. Ces cinq espèces ainsi qu'une espèce plus récemment décrite, *L. marthii* (isolée de sols et d'eaux) (Graves *et al.*, 2010) sont capables de se développer dans des vertébrés supérieurs. Toutes sont connues comme étant des *Listeria stricto-sensu* (Chiara *et al.*, 2015).

Onze autres espèces, non pathogènes, sont plus éloignées de *L. monocytogenes*. Celles-ci comprennent notamment une espèce isolée en 1971 de la végétation, *L. grayi* (Welshimer et Meredith, 1972), dont l'appartenance au genre *Listeria* a été remise en question sur la base des caractères phénotypiques (variation dans la structure antigénique) et génotypiques (CG% plus élevé et faible homologie de l'ADN). Les 10 autres espèces ont été récemment découvertes ou appartenaient au genre *Brochothrix* (Weller *et al.*, 2015). *L. fleischmannii*, subdivisée en deux sous-espèces *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii* et *L. fleischmannii* subsp. *Coloradenensis* (isolées de fromage et d'environnements agricoles), *L. floridensis* et *L. aquatica* (isolées d'eau de surface) (den Bakker *et al.*, 2014), sont génétiquement proches de *L. grayi* (Weller *et al.*, 2015). *L. rocourtiae* (isolée de végétaux) (Leclercq *et al.*, 2010), *L. cornellensis*, *L. riparia* et *L. grandensis* (isolées du milieu agricole et de l'eau) (den Bakker *et al.*, 2014), *L. weihenstephanensis* (isolée de végétation aquatique) (Halter *et al.*, 2013; den Bakker *et al.*, 2014), *L. booriae* (isolée de fruits de mer) (Weller *et al.*, 2015) et *L. newyorkensis* (isolée d'une usine de transformation du lait) (Weller *et al.*, 2015) constituent le clade basal du genre (Chiara *et al.*, 2015).

## IV. 3. Réservoirs de *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* est peu exigeante et capable de croître dans des conditions défavorables. Cette bactérie ubiquitaire et tellurique est très largement répandue dans l'environnement. Elle est très résistante dans le milieu extérieur et peut rester pendant 1 à 2 ans dans le sol, les fruits et les légumes, les viandes, les saucisses, le lait et les produits laitiers, les fèces, la paille (Farber et Paterkin, 1991 ; Guerini *et al.*, 2007). On la retrouve

notamment dans les eaux de diverses origines (rivières, lacs, eaux d'égouts), sur les végétaux et plus précisément dans les ensilages. L'ensilage est une méthode de conservation du fourrage par voie humide passant par la fermentation lactique anaérobie, donc il est possible de retrouver *L. monocytogenes* dans les ensilages de mauvaise qualité qui sont souvent à l'origine de la contamination des ruminants. Elle a aussi été isolée dans de très nombreuses espèces animales (animaux d'élevages) qui sont généralement des porteurs intestinaux asymptomatiques comme dans certains cas chez l'homme. Les bovins, les ovins, les porcins et les volailles sont les principales espèces concernées. Ces espèces animales peuvent développer des formes cliniques similaires à celles observées chez l'homme. Finalement, on retrouve *L. monocytogenes* dans les produits alimentaires et les produits industriels destinés à la consommation (Catteau, 2006).

#### **IV. 4. Définition et étiologie de la listériose**

*L. monocytogenes* est une bactérie saprophyte à Gram positif, largement répandue dans la nature. Cette bactérie responsable d'infections sporadiques sévères chez l'homme et les animaux est invasive, capable de traverser le placenta et de pénétrer le système nerveux central (méningoencéphalites).

La listériose est une infection alimentaire due à *L. monocytogenes*. Elle touche, principalement dans les pays industrialisés, les populations à risque comme les femmes enceintes, les nouveau-nés, les personnes âgées et les personnes dont les défenses immunitaires sont perturbées à la suite d'un traitement ou d'une maladie (Van Kessel *et al.*, 2004). Les produits laitiers les plus fréquemment contaminés par *L. monocytogenes* sont les fromages à pâte molle et au lait cru. La présence de *L. monocytogenes* dans le lait cru et le lait en vrac a été rapportée par plusieurs auteurs (Moshtaghi et Mohamadpour, 2007 ; Van Kessel *et al.*, 2004).

*L. monocytogenes* est un psychrotrophe ubiquitaire capable de survivre dans des conditions de stress froid et salin. Elle est rencontrée dans l'industrie de la transformation et le traitement des aliments (Elmnasser *et al.*, 2006). Usuellement, la présence des espèces de *Listeria* dans un aliment est un indicateur d'une hygiène pauvre (Cocolin *et al.*, 2002 ; Jemmi, et Stephan, 2006). Le traitement par la chaleur réduit significativement la concentration de *L. monocytogenes*, donc le lait pasteurisé ne représente pas un risque important pour la santé humaine (Sanaa *et al.*, 1993).

*L. monocytogenes* est aérobie-anaérobie facultative chimio-organo-hétérotrophe. Elle est catalase positive (ce caractère distingue les espèces de *Listeria* des Streptocoques) et oxydase négative (Ryan et Ray, 2004).

## IV. 5. Caractères bactériologiques

### IV. 5. 1. Caractères morphologiques

Les cellules de *Listeria* sont des bâtonnets Gram<sup>+</sup> courts et réguliers, de 0,4-0,5 µm de diamètre et 0,5-2 µm de longueur, avec des extrémités arrondies. Quelques cellules peuvent être incurvées. La longueur de la cellule n'est pas corrélée avec la cinétique de croissance (Zaika et Fanelli, 2003). Les cellules sont isolées ou regroupées en courtes chaînettes. Bien qu'une capsule a été observée dans des conditions particulières de culture, certains microbiologistes pensent que *L. monocytogenes* devrait être considérée comme une espèce bactérienne non capsulée. La bactérie ne forme pas de spores. Elle est mobile quand elle est cultivée à 20-25°C grâce à la présence des flagelles péritriches, et immobile ou faiblement mobile à 37°C en raison du manque d'expression flagelline à cette température (Way *et al.*, 2004).

### IV. 5. 2. Caractères cultureux

Lorsqu'elle est cultivée sur une gélose nutritive, *L. monocytogenes* forme des colonies de 1 à 2 mm de diamètre, translucides aux bords réguliers, apparaissant bleu/vert lors d'un éclairage oblique. Elle se développe dans une gamme de pH allant de 4 à 9. Cette bactérie mésophile dont la croissance optimale se situe entre 30 et 37°C, peut se développer à des températures proches de 0°C. *L. monocytogenes* tolère une concentration en NaCl de 10% (Low et Donachie, 1997).

### IV. 5. 3. Caractères biochimiques

Les caractères d'identification de *L. monocytogenes* sont regroupés dans le tableau N° 8.

**Tableau N° 8 : Caractères biochimiques d'identification de *L. monocytogenes* d'après Don Warbuton *et al.*, (2012)**

Test	Résultats	Test	Résultats
hémolyse β	+ <sup>a</sup>	Production d'acide à partir de	
CAMP test		mannitol	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	D-ribose	-
<i>Rhodococcus equi</i>	V	glucose 1 phosphate	-
esculine	+	D-tagatose	-
H <sub>2</sub> S	-	D-xylose	-
indole	-	L-rhamnose	+
nitrate réductase	-	α-méthyl-D-mannoside	+
uréase	-		
gélatinase	-		

<sup>a</sup> ≥ + 90% des souches sont positives ;  
- 90% des souches sont négatives .

#### IV. 6. Caractères sérologiques

L'espèce *L. monocytogenes* est divisée 13 sérotypes (tableau N° 9) dont l'identification est fondée sur la recherche d'antigènes somatiques (O) et flagellaires (H). Douze antigènes O, thermostables, très variables entre les sérotypes, ont été décrits. Les variations observées parmi les antigènes O sont associées à la biochimie des acides téichoïques du peptidoglycane (den Bakker *et al.*, 2014). Quatre antigènes H, thermolabiles, sont considérés comme conservés dans la majorité des sérotypes de *L. monocytogenes* (den Bakker *et al.*, 2014).

Depuis 2005, le Centre National de Référence (CNR) des *Listeria*, de Paris, utilise une méthode PCR par réaction multiplex sur 5 gènes qui permet de classer les souches en 5 sérogroupes : IIa (sérotypes 1/2a et 3a), IIb (sérotypes 1/2b et 3b), IIc (sérotypes 1/2c et 3c), IVb (sérotypes 4b, 4d et 4e) et L (autres sérotypes) (Doumith *et al.*, 2004a).

**Tableau N° 9 : Structure antigénique des sérotypes de *L. monocytogenes* d'après Farber et Peterkin (1991)**

sérotypes	antigène O	antigène H
1/2a	I II (III)	A B
1/2b	I II (III)	A B C
1/2c	I II (III)	B D
3a	II (III) IV	A B
3b	II (III) IV	A B C
3c	II (III) IV (XII) (XIII)	B D
4a	(III) (V) VII IX (XII) (XIII)	A B C
4ab	(III) V VI VII IX X	A B C
4b	(III) V VI	A B C
4c	(III) V VII	A B C
4d	(III) (V) VI VIII	A B C
4e	(III) V VI (VIII) (IX)	A B C
7	(III) XII XIII	A B C

Les parenthèses indiquent que l'antigène n'est pas systématiquement exprimé.

En raison du faible pouvoir discriminant de la sérotypie, d'autres méthodes de typage ont été favorisées. Les souches de *L. monocytogenes* ont dans un premier temps été différenciées par lysotypie (Audurier et Martin, 1989). Depuis les années 1990, des méthodes d'empreintes moléculaires telles que le ribotypage, la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) se sont développées (Wiedmann *et al.*, 1997 ; Boscher *et al.*, 2012).

#### IV. 7. Caractères génomiques

Le premier séquençage du génome entier de *L. monocytogenes* et son analyse ont été réalisés en 2001 par un consortium de 10 laboratoires européens (Glaser *et al.*, 2001) sur la souche EGD-e (sérotipe 1/2a) initialement isolée de lapins atteints de listériose par Murray *et*

*al.* (1926). Il existe actuellement 63 souches de *L. monocytogenes* dont le génome a fait l'objet d'un séquençage complet. La comparaison de 34 génomes étudiés par deux équipes américaines (Deng *et al.*, 2010; den Bakker *et al.*, 2013) montre que le génome de *L. monocytogenes* comprend 1,81 à 3,14 mégabases (Mb) et possède 2710 à 3253 gènes.

Le génome de la souche EGD-e, utilisé comme génome de référence, comporte 2,94 Mb avec un GC% moyen de 39%. Il possède 2 853 gènes codant des protéines dont 35% d'entre-elles ont des fonctionnalités inconnues. Il comprend de nombreux gènes permettant une colonisation d'habitats diversifiés, tels que des gènes codant des protéines de surface, des transporteurs, des protéines sécrétées et des régulateurs transcriptionnels. Glaser *et al.* (2001) ont mis en évidence des gènes codants 86 protéines sécrétées et 68 lipoprotéines. Certaines de ces protéines sont impliquées dans la virulence de *L. monocytogenes* à l'exemple de la listériolysine O (LLO), des phospholipases PlcA, PlcB et de l'internaline InlC. D'autres protéines jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique telle que des lipases et les chitinases. Parmi les 331 gènes codant des transporteurs, 26% sont impliqués dans le transport de glucides par un système phosphotransférase dépendant du phosphoenolpyruvate (PTS). Ce nombre élevé de gènes souligne l'aptitude de la souche EGD-e à utiliser des sources de carbone variées en fonction des ressources disponibles dans son environnement, notamment lors de son adaptation à l'environnement tellurique (Leisner *et al.*, 2008, Piveteau *et al.*, 2011) ou lors des étapes de la vie intracellulaire (Chico-Calero *et al.*, 2002). Le génome de la souche EGD-e comprend 209 régulateurs de transcription qui représentent 7,9% du génome total. Cette forte proportion, proche de celle de *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%), bactérie également ubiquiste, n'est pas surprenante dans la mesure où l'adaptation de *L. monocytogenes* à différents environnements nécessite des systèmes de régulation. Ces régulateurs comprennent notamment 5 facteurs Sigma qui interviennent lors de l'initiation de la transcription de gènes en fonction des stimuli environnementaux. La souche EGD-e ne contient pas d'ADN extra-chromosomique. Toutefois, les études de Lebrun *et al.* (1994) et Kuenne *et al.* (2010) ont montré qu'un tiers des souches de *L. monocytogenes* (principalement isolées de produits alimentaires) portait des plasmides porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et aux stress oxydatifs.

Il a été identifié chez *L. monocytogenes* des petits ARNs non codants (ARNnc) qui sont exprimés à partir des régions intergéniques du génome, souvent en réponse à un stress ou à des modifications du milieu environnant. Ils peuvent réguler sélectivement l'expression d'un ou plusieurs gènes en modulant la traduction et/ou la stabilité des ARNm correspondants. Des analyses transtriptomiques de *L. monocytogenes* ont ainsi permis de mettre en évidence 210



ARNnc régulateurs qui seraient impliqués dans l'adaptation au stress oxydatif, au manque de fer, aux basses températures ainsi qu'à la vie intracellulaire (Nielsen *et al.*, 2008; den Bakker *et al.*, 2010; Kuenne *et al.*, 2013).

#### **IV. 8. Epidémiologie**

*L. monocytogenes* est une souche pathogène de l'homme et de l'animal. *L. monocytogenes* est la seule espèce du genre *Listeria* à être considérée comme pathogène chez l'homme. Cependant, bien que *L. ivanovii* est considérée comme non pathogène pour l'homme, il est à noter que 8 cas de listériose dus à cette espèce ont été rapportés (Cummins *et al.*, 1994 ; Lessing *et al.*, 1994 ; Snapir *et al.*, 2006).

La listériose est une infection essentiellement animale, accidentellement humaine. Elle sévit de façon sporadique chez les animaux, mais peut évoluer de façon endémique dans certains élevages en fonction des techniques d'élevage. Elle semble être présente surtout dans les zones tempérées, mais on peut la rencontrer dans le monde entier. On parle de géonose ou sapronose (ou saprozoonose) : la contamination des animaux s'effectue le plus généralement par ingestion des végétaux (AFSSA, 2000).

Les animaux de rente sont porteurs de *L. monocytogenes* (Nightingale *et al.*, 2004 ; Nightingale *et al.*, 2005). L'incidence de *L. monocytogenes* est supérieure dans les fermes de bovins que dans les fermes de petits ruminants, respectivement 24% et 6% (Nightingale *et al.*, 2004). De plus, la prévalence du pathogène varie suivant les saisons. Elle est plus élevée durant la période hivernale. Ce phénomène peut être expliqué par l'accroissement des risques de contamination pendant la stabulation des animaux (Nightingale *et al.*, 2005). L'utilisation des ensilages durant l'hiver pourrait également expliquer l'augmentation des cas de contamination sur cette période. Le suivi de l'excrétion de *L. monocytogenes* dans une exploitation laitière a en effet montré que jusqu'à 94% des vaches avaient excrété au moins une fois *L. monocytogenes* durant la période d'étude (Ho *et al.*, 2007). De plus, le portage intestinal de *L. monocytogenes* et sa présence dans les fèces ont été démontrés pour de nombreuses espèces animales (Wesley, 1999).

Ce portage animal de *L. monocytogenes* dans l'environnement agricole peut conduire à la contamination des productions animales comme le lait cru (Hunt *et al.*, 2012) ou la viande (Mohammed *et al.*, 2010, Morild *et al.*, 2011, Dmowska *et al.*, 2013). La contamination des matières premières agricoles est une voie d'entrée du pathogène vers le secteur agroalimentaire.

La listériose humaine se présente généralement sous forme de cas sporadiques, plus rarement de cas groupés et peut être parfois responsable d'épidémies. Les listérioses sporadiques sont souvent considérées comme un problème spécifique des pays industrialisés de l'hémisphère Nord.

L'augmentation de l'incidence des listérioses dans les pays industrialisés de l'hémisphère Nord pourrait s'expliquer par le vieillissement de la population, l'augmentation du nombre de personnes immunodéprimées (cancéreux, malades greffés...), l'évolution des habitudes alimentaires privilégiant les plats préparés, la consommation importante d'aliments à risques (fromage au lait cru, charcuterie) et l'augmentation des dates limites de consommation.

En comparaison avec d'autres pathogènes responsables d'infections d'origine alimentaire, la listériose a une incidence faible, mais conduit à une fréquence d'hospitalisation et un taux de mortalité élevés (Desneux, 2015).

#### **IV. 9. Modes de transmission**

Les principales voies de contamination des animaux (en particulier les animaux de rente) sont l'ensilage (Vazquez-Boland *et al.*, 1992, Welchman *et al.*, 1997) et les animaux eux-mêmes. Les animaux porteurs excréant *L. monocytogenes* contribuent à la dispersion du pathogène dans le sol et la nourriture du bétail, créant ainsi un cycle continu fécal-oral (Nightingale *et al.*, 2004, Ho *et al.*, 2007).

La contamination des matières premières végétales et animales est une voie importante d'entrée de *L. monocytogenes* dans les entreprises agroalimentaires (Fox *et al.*, 2011, Gelbicova et Karpiskova, 2012). Ceci pose des problèmes sanitaires puisque la présence de *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires entraîne la contamination d'une part non négligeable des denrées alimentaires (Cox *et al.*, 1997). L'aliment est le principal vecteur de la maladie listériose.

Le mode de transmission le plus classique de la listériose chez l'Homme est l'ingestion de denrées alimentaires contaminées. La capacité de *L. monocytogenes* à survivre dans des conditions de stress osmotique, salin et acide, et son aptitude à se multiplier à des températures basses lui permettent de survivre dans une large gamme d'aliments (Rocourt *et al.*, 2003, Koch *et al.*, 2010, Jamali *et al.*, 2013). Les aliments les plus à risque pour la transmission de la listériose sont les aliments dont la durée de conservation est longue et dont la consommation peut se faire en l'état (pas de cuisson nécessaire) (Porto-Fett *et al.*, 2013). Se

retrouvent notamment dans cette catégorie les fromages fabriqués à partir de lait cru, les produits de charcuterie, les légumes crus, les produits de la mer et les plats préparés.

Un autre mode de transmission beaucoup plus rare est le contact direct avec un animal contaminé (McLauchlin et Low, 1994). Enfin la transmission peut également se faire de la mère au fœtus ou au nouveau-né par passage de la bactérie du sang de la mère au placenta ou lors de l'accouchement (Smith *et al.*, 2009, Tahery *et al.*, 2009, Mokta *et al.*, 2010).

#### IV. 10. Pathogénie

L'entrée de la bactérie dans l'organisme de l'hôte s'opère par le franchissement de la barrière intestinale. Le passage de la muqueuse à l'échelle cellulaire est réalisé par l'invasion des entérocytes et/ou des cellules M des plaques de Peyer. Les bactéries se retrouvent ensuite dans les cellules phagocytaires de la lamina propria où elles survivent et se multiplient. Après avoir traversé la barrière intestinale, *via* la circulation sanguine ou lymphatique, *L. monocytogenes* rejoint le foie et la rate où elle se multiplie. Par la circulation sanguine, *L. monocytogenes* atteint ensuite le cerveau et le placenta (figure N° 3) (Lecuit 2007; Cossart et Toledo-Arana, 2008).

L'infection cellulaire par *L. monocytogenes* se déroule en cinq étapes au cours desquelles différents facteurs de virulence vont intervenir. Ces cinq étapes sont : l'internalisation, la lyse membranaire du phagosome et la réplication dans le cytosol, la polymérisation de l'actine, le passage de cellule à cellule, la lyse de la double membrane du phagosome.

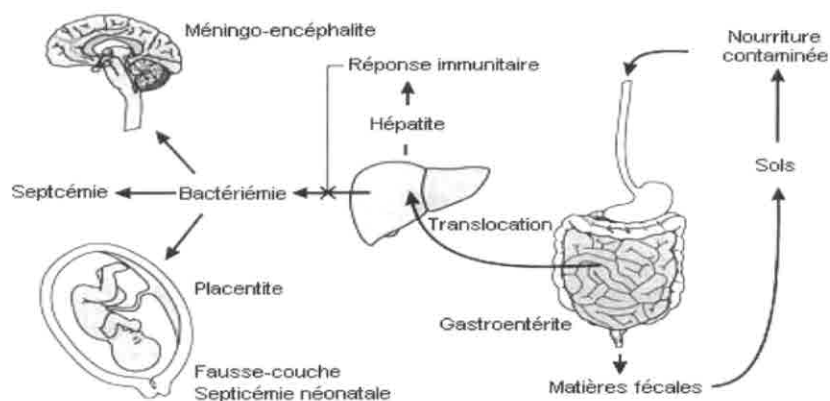


Figure N° 3 : Le cycle d'infection de *L. monocytogenes* chez l'homme (Moroni, 2007).

#### IV. 11. Facteurs de virulence (figure N° 4)

La première étape de l'infection consiste en une internalisation dans les entérocytes et fait intervenir plusieurs facteurs de virulence.

- **InlA** code pour l'internaline, une protéine que l'on retrouve à la surface des bactéries et dans le milieu extracellulaire (Gaillard *et al.*, 1991). Son rôle est essentiel pour la pénétration dans les entérocytes (Morillon et Garnotel, 2008).

- **InlB** est le second membre de la famille des internalines qui a été cloné et séquencé. Il code pour une protéine de 630 acides aminés.

La deuxième étape de l'infection est la lyse du phagosome où les facteurs de virulence sont la lystériolysine O spécifique de *L. monocytogenes* et la phospholipase.

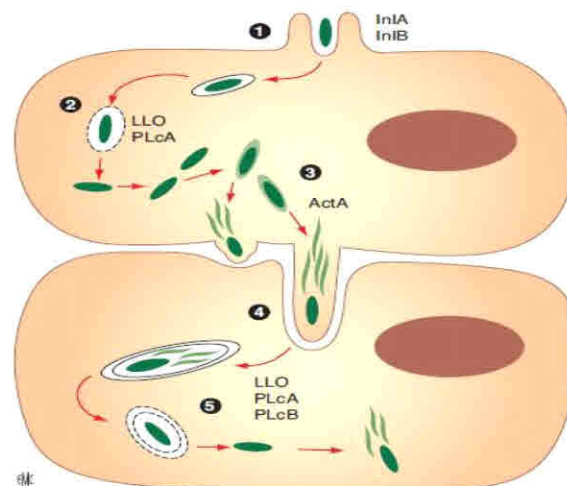
- **La lystériolysine O** : le gène *hly* code pour la lystériolysine O (LLO) c'est le premier facteur de virulence identifié chez *L. monocytogenes*. C'est une hémolysine de structure protéique appartenant à la famille des hémolysines thiols-activées. Son importance dans la vie de la bactérie a été démontrée par une expérience réalisée par Bielecki au cours de laquelle *Bacillus subtilis*, une bactérie exclusivement extracellulaire et non pathogène, était transformée avec le gène *hly*. Après transformation, elle était capable à la suite de son internalisation dans des cellules phagocytaires de détruire la membrane du phagosome et de se diriger vers le cytoplasme pour se multiplier (Bielecki *et al.*, 1990). Les souches cliniques sont hémolytiques et sont aisément identifiables sur des boîtes de gélose au sang par un halo clair autour des colonies, alors que les souches non-hémolytiques isolées de l'environnement ou des porteurs sains sont avirulentes lorsqu'on les teste chez les souris. La LLO est une toxine stable en pH acide ; à pH neutre elle se déplie et se trouve neutralisée. Ceci permet la sortie de la vacuole sans endommager la membrane (Morillon et Garnotel, 2008).

- **La Phospholipase C**: en amont du gène *hly* on rencontre le gène *PlcA* qui code pour une phospholipase C. Cette enzyme extracellulaire de 36,3 kDa est capable d'hydrolyser le phosphatidylinositol et les groupements glycosylphosphatidylinositols. La phospholipase C (PI-PLC) interviendrait dans le processus d'échappement de la vacuole de phagocytose (Camilli *et al.*, 1993).

La troisième étape est la polymérisation de l'actine. Au cours de cette étape de réplication, l'actine F de la surface de *L. monocytogenes* se polymérise en actine G. Grâce à cette polymérisation la bactérie peut se propulser à l'intérieur et hors de la cellule. Elle est associée à une trainée d'actine appelée « comète d'actine ». Le gène *ActA* code pour la protéine ActA, c'est une protéine de surface de 639 acides aminés qui n'interagirait pas directement avec l'actine. Mais elle interagit avec des protéines cellulaires comme la proline et contribue au processus de nucléation de l'actine (Kocks *et al.*, 1992 ; Domann *et al.*, 1992 ; Cossart et Kocks, 1994).

La quatrième étape de l'invasion cellulaire : les mouvements intracellulaires sont provoqués par la protéine ActA lors de l'étape du passage de cellule à cellule. Les mutants ActA-négatif sont incapables de passer de cellule en cellule et de donner les plages de lyses observées lorsqu'on cultive les souches virulentes et qui témoignent de leur capacité de diffusion intercellulaire. Ce mécanisme apparaît important pour la virulence et la survie intracellulaire de *L. monocytogenes* car elle est à l'abri du système immunitaire à l'intérieur de la cellule. Les mutants ActA-négatif s'avèrent avirulents pour les animaux de laboratoires (Kocks *et al.*, 1992).

La cinquième étape se réalise par la lyse de la double membrane du phagosome. En effet, les bactéries qui pénètrent dans les cellules adjacentes sont entourées d'une membrane interne qui est la membrane cytoplasmique de la cellule infectée d'origine et d'une membrane externe qui est la membrane cytoplasmique de la nouvelle cellule qui reçoit la bactérie (De Chastellier et Berche, 1994). L'échappement à cette vacuole à double membrane implique la LLO, la phosphatidyl-choline phospholipase C (PC-PLC) codée par le gène *plcB*.



**Figure N° 4: Etapes de l'infection de la cellule par *L. monocytogenes* et les facteurs de virulence impliqués** 1) internalisation 2) lyse membranaire 3) polymérisation de l'actine 4) passage de cellule à cellule. 5) lyse de la double membrane du phagosome (Morillon et Garnotel, 2008)

#### IV. 12. Signes cliniques

La listériose est une maladie humaine et animale touchant les animaux sauvages et domestiques. Le pouvoir pathogène de *L. monocytogenes* est principalement dû à sa capacité de parasitisme intracellulaire (Le Monnier et Leclercq, 2009). La bactérie est en effet capable de pénétrer les cellules non phagocytaires, de survivre dans les macrophages et de franchir les barrières comme l'épithélium intestinal, la barrière hémato-encéphalique et la barrière de l'unité-foeto-placentaire (Cossart et Toledo-Arana, 2008).



Chez les petits animaux, la maladie est caractérisée par une monocytose avec la présence d'abcès hépatiques et cardiaques. Chez les ruminants, *L. monocytogenes* provoque des septicémies, des encéphalites et des avortements (Low et Donachie, 1997). Des mammites ont également été associées à l'infection à *L. monocytogenes* chez les ruminants (OIE, 2005b).

La listériose humaine touche préférentiellement les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. Quatre sérovars (1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b) sont responsables de plus de 95% des listérioses (Doumith *et al.*, 2004b). Les infections peuvent être asymptomatiques ou se traduire par un état pseudo-grippal avec des courbatures, maux de tête, fièvre et troubles digestifs non spécifiques d'une listériose. Lorsqu'elles sont aiguës, elles sont fréquemment associées à une atteinte du système nerveux central et des méninges mais elles peuvent également être à l'origine de septicémies, de conjonctivites, de sinusites, de rhinites et d'atteintes pleuropulmonaires.

Chez les femmes enceintes la listériose peut provoquer une infection intrautérine accompagnée d'une mortalité élevée du fœtus ou du nouveau-né (Desneux, 2015).

#### **IV. 13. Techniques de recherche de *L. monocytogenes***

Depuis le début des années 1980, le rôle des aliments et particulièrement du lait de vache a été mis en évidence dans la contamination de l'industrie laitière et par conséquent dans la contamination humaine lors de flambées épidémiques de listériose. A cet effet, plusieurs méthodes de détection ont été proposées et développées de façon à isoler le plus rapidement possible les groupes génomiques de *Listeria monocytogenes*, responsable des principaux cas de listériose (Lebres, 2006).

##### **IV. 13. 1. Méthodes bactériologiques**

*L. monocytogenes* est une bactérie de l'environnement, ce qui la rend peu exigeante en élément nutritif et facilite son isolement des prélèvements biologiques. (Gasarov *et al.*, 2005). Leur isolement et identification dans les aliments, l'environnement ou les prélèvements vétérinaires nécessitent l'utilisation d'agents sélectifs et de procédures d'enrichissement de façon à limiter les micro-organismes contaminants à un niveau raisonnable et à permettre ainsi la multiplication de *L. monocytogenes* à un niveau suffisant pour assurer la détection de l'organisme. (OIE, 2005b). Dans les essais de culture traditionnelle, il est très difficile de détecter et d'énumérer *L. monocytogenes* dans les aliments surtout quand celle-ci est largement surpassée en nombre par les autres *Listeria spp.* spécialement *L. innocua*. Par



conséquent, la détection de *Listeria spp.* est souvent utilisée comme indication de la présence de *L. monocytogenes* (Cocolin *et al.*, 2002).

D'autres géloses utilisables pour l'isolement sont disponibles, il s'agit : des géloses Oxford (OXA), Oxford modifiée (MOX) PALCAM (PAL) (Modeste Tabi, 2014). Les milieux PALCAM et Oxford permettent, grâce à une association du chlorure de lithium et d'antibiotiques d'inhiber la microflore de contamination, et de reconnaître les colonies de *Listeria* par l'hydrolyse de l'esculine en glucose et en esculetine. Les tests d'identification se font préférentiellement avec la galerie API *Listeria*.

L'évolution des méthodes de recherche de *L. monocytogenes* a été très rapide. En 1986, cette recherche nécessitait 2 à 3 semaines. Aujourd'hui, elle peut se faire sans difficultés majeures à l'aide d'une méthode normalisée et reconnue Norme Française (NF), Norme Européenne (EN) et Norme Internationale (ISO : International Standard Organization) en 4 à 5 jours (ISO 11290-1 : Détection ; ISO 11290-2 : Dénombrement). C'est une méthode lourde, en plusieurs étapes, avec enrichissement primaire et secondaire en bouillon de Fraser et isolements sur milieux sélectifs, PALCAM et Oxford, après chaque étape d'enrichissement. La méthode AFNOR (Association Française de Normalisation) de routine pour la détection de *L. monocytogenes* correspond à la norme NF V 08 055 (AFSSA, 2000).

La recherche de *L. monocytogenes* par la Méthode AFNOR V08 055 nécessite plusieurs étapes et est réglementée dans le JORADP dans l'Arrêté du 21 Chaâbane 1426 correspondant au 25 septembre 2005 rendant obligatoire la méthode de recherche de *L. monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

La norme AFNOR V08 055 (déc 1993) est une méthode de routine de recherche de *L. monocytogenes* : détection, identification. Méthode relativement lourde, elle comprend les étapes suivantes :

- enrichissement primaire sur bouillon FRASER au 1/2 (24 h à 30°C)
- isolement sur gélose PALCAM ou OXFORD (37°C, 24 ou 48 heures)
- enrichissement secondaire sur bouillon FRASER incubé 24 et 48 h à 37°C
- isolement sur gélose PALCAM ou OXFORD (37°C, 24 ou 48 heures)
- Les colonies caractéristiques sont identifiées à l'aide de la méthode traditionnelle ou au moyen de galeries miniaturisées (la galerie API *Listeria* est bien adaptée) (Kaismoune, 2009).

#### **IV. 13. 2. Méthodes sérologiques**

Les épreuves sérologiques ne sont pas traditionnellement utilisées pour le diagnostic de la listériose. Elles sont majoritairement peu fiables, manquant de sensibilité et de spécificité.

D'une part, des réactions croisées considérables avec les déterminants antigéniques d'autres organismes Gram-positif ont été observés. D'autre part, Beaucoup d'individus sains sont porteurs au niveau intestinal (2 à 6 %) et une prévalence d'anticorps anti-*L. monocytogenes* dans le sérum a été retrouvée jusqu'à 53 % chez l'homme. Les taux de portage pour l'animal sont similaires à ceux des humains, avec des différences en fonction de l'espèce et un taux un peu plus élevé durant la saison de stabulation comparé à celui des animaux au pâturage (Husu, 1990 ; Iida *et al.*, 1991).

#### **IV. 13. 3. Méthodes d'identification par biologie moléculaire**

Plusieurs méthodes de détection de *L. monocytogenes* ont été mises en évidence, mais la culture conventionnelle reste une méthode de référence selon les normes internationales. Cependant, la culture prend beaucoup de temps entre 3 et 5 jours, pour cela des méthodes alternatives faciles, rapides ont été améliorées afin de mieux répondre aux besoins en réduisant le temps de détection. Parmi ces méthodes, les techniques basées sur la PCR (Polymerase Chain Reaction).

La grande majorité des tests de PCR utilisés pour l'identification de *L. monocytogenes* utilisent les amorces de la séquence du gène *hlyA* qui code pour la listériolysine O (LLO). *hlyA* fait partie des gènes de virulence de *Listeria* (Liu *et al.*, 2004). La listériolysine O (ou LLO) a été le premier facteur de virulence identifié chez *L. monocytogenes* (Gaillard *et al.*, 1986). Cette protéine est une hémolysine de 60 kDa qui appartient à la famille des cytolysines cholestérol dépendantes. Les hémolysines sont des protéines cytolytiques extracellulaires qui agissent en formant des pores, détruisant ainsi la barrière semi-perméable de la membrane cellulaire (Farber, 1991; Portnoy *et al.*, 1992). Le phénomène hémolytique est un marqueur fondamental de différenciation et d'identification de *Listeria spp.* (Rodriguez *et al.*, 1986; Flinders et Donnelly, 1994). La listériolysine O est détectée par l'amplification du gène *hlyA*.

L'application de la PCR en temps réel a aussi été développée en tant que méthode quantitative de détection spécifique pour *L. monocytogenes*, (Hough, 2002) et a montré un bon potentiel pour l'analyse en routine. Pour la PCR en temps réel, la spécificité et la sensibilité sont meilleures, la durée de réalisation de l'analyse est plus courte et c'est le germe recherché ou le groupe de bactéries à caractériser qui commandent le système utilisé (Roux et Rolain, 2014).

## **IV. 14. Lutte contre *L. monocytogenes***

### **IV. 14. 1. Traitement**

Le traitement consiste en une antibiothérapie, qui doit être administrée précocement. *L. monocytogenes* est une bactérie habituellement sensible aux antibiotiques avec moins de 15% de souches résistantes (Carlier, 2000). Les résistances concernent les tétracyclines et les macrolides (Charpentier et Courvalin, 1999). Les pénicillines (pénicillines G, ampicilline), les aminosides (gentamicyne), ainsi que l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole sont les antibiotiques utilisés seuls ou en association.

Le traitement peut rencontrer certains problèmes qui sont susceptibles de le rendre inefficace. Il s'agit : de la localisation intracellulaire facultative de *L. monocytogenes* et de l'émergence de certaines souches multirésistantes (Morvan *et al.*, 2010).

La durée du traitement doit être de 3 à 4 semaines afin d'éviter les rechutes. En dépit de l'antibiothérapie les séquelles neurologiques sont fréquentes (AFSSA, 2000).

En ce qui concerne, les vaches ayant avortées, et dans le but de minimiser au maximum les foyers infectieux, il est vivement conseiller aujourd'hui de les abattre, car elles restent excrétrices de *Listeria* pendant très longtemps, jusqu'à 6 mois et plus (Lebres, 2006).

### **IV. 14. 2. Prophylaxie**

La prophylaxie des infections à *Listeria* et notamment des anadémies de listériose humaine est avant tout une prophylaxie sanitaire qui nécessite un contrôle de tous les échelons de la filière agro-alimentaire. Cette prévention est toutefois très délicate car les *Listeria* spp. sont des germes ubiquistes dont l'éradication est illusoire (Kaismoune, 2009).

Les procédés de pasteurisations permettent de réduire considérablement les quantités de *L. monocytogenes* dans les aliments étant donné qu'elle ne produit pas de spore, mais des phénomènes de thermorésistance ont été observés lors de l'exposition à une température de 65 C pendant 20 minutes (Larpen, 2000). *L. monocytogenes* n'est pas une bactérie naturellement thermorésistante, on peut la détruire rapidement à 60°C (Bréand *et al.*, 1998). Sa thermo-tolérance serait donc probablement influencée par des prétraitements thermiques. En effet, un préchauffage à 47,5°C pendant 3 heures peut entraîner la résistance ultérieure à une température de 65°C (Pagan *et al.*, 1997). Une protection thermique peut aussi être observée dans des aliments très gras ou très sucrés (Juneja *et al.*, 1998 ; Pan *et al.*, 2010).

La prophylaxie médicale (vaccination et/ou antibioprophyllaxie) n'est pas utilisée.

#### **a. Prophylaxie dans les élevages**

Dans les élevages, plusieurs points forts sont à maîtriser :

- l'animal lui-même : la prophylaxie passe nécessairement par le dépistage systématique en vue de détecter les vaches excrétrices. Cette recherche doit s'effectuer avec un rythme annuel ou semestriel et devra être réalisée à l'échelon individuel ou collectif. La réforme des femelles excrétrices est une nécessité (Kaismoune, 2009).
- L'alimentation : les ensilages constituent les principaux foyers d'entretien et de multiplication des *Listeria*, ils doivent être correctement préparés et conservés. Un soin particulier doit être apporté au tassement et à l'absence de mottes de terre. Certains auteurs préconisent l'ensemencement des ensilages avec des souches de *Lactococcus lactis* ou de *Lactobacillus plantarum* qui inhibent la croissance des *Listeria* (El Mouhtadi, 2014).
- L'hygiène des locaux et en particulier l'hygiène de la salle et du matériel de traite. Les désinfectants classiques (détergent acide anionique, ammonium quaternaire, iode, hypochlorite) sont actifs sur *L. monocytogenes* (El Mouhtadi, 2014).
- Le lait stocké à la ferme doit être conservé à une température ne dépassant pas 4 ° C et une recherche systématique de *Listeria* sp. doit être entreprise en vue de détecter les vaches excrétrices. Cette recherche peut s'effectuer avec un rythme annuel ou semestriel et être réalisée à l'échelon individuel ou, pour les grands effectifs, sur des échantillons successifs de taille de plus en plus réduite. La réforme des femelles excrétrices est une nécessité (Kaismoune, 2009).

#### **b. Prophylaxie dans les industries**

*L. monocytogenes* est introduite dans le milieu industriel par les matières premières contaminées, par les équipements de manutention contaminés, par les chaussures et les vêtements du personnel et par les individus porteurs sains.

Par conséquent, la prophylaxie de la listériose sera fondée sur :

- la sélection rigoureuse des matières premières,
- traitement antimicrobien des matières premières par ionisation, irradiation, système lactoperoxydase, utilisation d'antimicrobiens biologiques et traitement par des acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide citrique ou l'acide acétique.
- le strict respect des plans de nettoyage et de désinfection,
- le strict respect des bonnes pratiques de fabrication.
- L'hygiène de l'abattage est cruciale.
- Respect de la chaîne du froid et réduction des dates limites de consommation (El Mouhtadi, 2014).

**c. Prophylaxie chez l'homme**

La prophylaxie de la listériose humaine est avant tout, une prophylaxie sanitaire fondée sur une éducation sanitaire exemplaire et irréprochable.

L'hygiène corporelle et vestimentaire, individuelle et collective, des manipulateurs doit être rigoureuse. La formation et la sensibilisation du personnel sont particulièrement importantes.

La médecine du travail préconise dans ce sens, en plus de la visite médicale d'embauche, deux contrôles annuels avec dépistage systématique des porteurs sains et insiste beaucoup sur la formation et l'éducation sanitaire (Oteng-Gyang, 1984 ; OMS/FAO, 1999).

Par ailleurs, la vaccination et/ou antibioprophyllaxie n'est pas utilisée et, selon un avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (approuvé le 29 juin 1999), il n'y a pas lieu de recommander une antibioprophyllaxie systématique en cas de consommation d'un aliment contaminé par *L. monocytogenes* (Anonyme, 1999).

En conclusion, la prophylaxie de la listériose humaine est basée essentiellement sur l'information des populations à risque et sur l'éducation sanitaire.

Les meilleurs conseils que l'on puisse donner aux consommateurs, sont ceux dictés par le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (N° 4 du 25 janvier 2000) à savoir :

- Eviter la consommation de lait cru et de produits à base de lait cru,
- Cuire soigneusement les aliments crus d'origine animale,
- Laver soigneusement les légumes crus et les herbes aromatiques,
- Dans le cas de repas qui ne sont pas pris en collectivité, les restes alimentaires et les plats cuisinés doivent être réchauffés soigneusement avant consommation immédiate,
- Conserver les aliments crus, séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés,
- Se laver les mains, nettoyer les ustensiles de cuisine après la manipulation d'aliments non cuits,
- Nettoyer fréquemment et désinfecter ensuite avec de l'eau de Javel son réfrigérateur,
- S'assurer que la température du réfrigérateur est suffisamment basse : 4°C,
- Respecter les dates limites de consommation,
- Eviter les croûtes des fromages (Kaismoune, 2009).

# **PARTIE EXPERIMENTALE**



## PROBLEMATIQUE

Au cours des dernières décennies, il a été constaté une incidence croissante des maladies d'origine alimentaire dans le monde et en particulier en Algérie, celles-ci sont liées à la présence de différents microorganismes dans les aliments. Ces maladies constituent le problème de santé publique le plus répandu et génèrent un lourd fardeau économique et social représentant ainsi une source de souffrances humaines.

Le produit phare de la liste des produits de large consommation reste le lait; plus particulièrement le lait cru de vache en raison de sa riche composition nutritionnelle : matières grasses, matières azotées, lactose, sels minéraux, vitamines et eau (Guiraud, 2003); cependant il n'est pas sans risque pour le consommateur car il constitue le foyer par excellence pour la communauté bactérienne. Cela va conduire à un fait évident : la biodiversité observée dans ce produit (Gerrit, 2003).

Le lait et les produits laitiers sont parmi les aliments les plus contrôlés depuis la ferme jusqu'au point de vente. Ils sont soumis à une chaîne de vérifications dont l'objectif est de garantir la sécurité du consommateur. Elle regroupe un ensemble de règles de travail et de contrôles institué tant par les pouvoirs publics que par la profession laitière. La qualité du produit à la ferme est surtout liée à l'hygiène, que ce soit des locaux, du matériel, du personnel, de la traite, mais aussi à la surveillance sanitaire des animaux et à une alimentation de qualité (AFSSA, 2000).

Cependant malgré tous leurs avantages, le lait et les produits laitiers peuvent être des causes de maladies. La brucellose est un des exemples classiques de zoonose alimentaire transmise par le lait. C'est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et à l'homme, due à des coccobacilles immobiles, Gram négatif appartenant au genre *Brucella*. Les trois principales espèces de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) peuvent contaminer l'homme et être excrétées dans le lait des animaux infectés (Blétry et al., 2009). Chez les animaux atteints de brucellose, il y a excrétion continue ou intermittente des *Brucella* dans le lait lors des lactations successives. Chez les animaux, la brucellose bovine, essentiellement due à *Brucella abortus* reste la plus répandue en Afrique (McDermott et Arimi, 2002).

La listériose est une infection alimentaire due à *Listeria monocytogenes*. La présence de *L. monocytogenes* dans le lait cru et le lait en vrac a été rapportée par plusieurs auteurs (Van Kessel *et al.*, 2004 ; Hamdi *et al.*, 2007 ; Moshtaghi et Mohamadpour, 2007). Les produits laitiers les plus fréquemment contaminés par *L. monocytogenes* sont les fromages à pâte molle et au lait cru.

La consommation de produits laitiers de mauvaise qualité peut mettre en danger la santé des consommateurs et même causer des problèmes de santé publique.

Il existe de très nombreux types de risques, mais dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons aux risques provoqués par les dangers liés aux denrées alimentaires d'origine animale (DAOA) et plus particulièrement au risque microbiologique lié à la consommation du lait cru.

## OBJECTIFS

L'objectif de ce travail consiste à étudier deux bactéries pathogènes *Listeria* et *Brucella* en tant que contaminants alimentaires, aboutissant chez l'homme respectivement à deux zoonoses : la Listériose et la Brucellose.

Cette étude se base sur la détection de la présence des *Brucella* spp. chez des vaches laitières testées auparavant séronégatives et de *L. monocytogenes* dans le lait cru dans la région de Batna par l'utilisation de la technique PCR en temps réel, afin d'évaluer le danger encouru pour le consommateur de lait cru dans la région d'étude.

La détection d'échantillons positifs par PCR, alors qu'ils étaient testés négatifs par sérologie, signifie qu'il existe des insuffisances actuellement dans le programme d'éradication de la brucellose et que les techniques de sérologie utilisées actuellement par nos laboratoires doivent être actualisées.

L'intérêt de la recherche de *L. monocytogenes* est confirmé par l'importance que lui accorde le Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire N° 3, arrêté du 21 Chaâbane 1426 correspondant au 25 septembre 2005 rendant obligatoire la recherche de *L. monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

Le danger de la transmission de *Brucella* spp. au consommateur doit être évité selon l'article N° 19, de l'arrêté interministériel du 3 Chaâbane 1416 correspondant au 26 décembre 1995 fixant les mesures de prévention et de lutte spécifiques à la brucellose bovine qui stipule que : "Le lait de vache ne peut être utilisé et vendu à l'état cru sauf à destination d'un atelier de pasteurisation ou après que l'exploitation soit reconnue indemne. En cas d'usage sur place, il ne doit être utilisé qu'après ébullition".

## I. MATERIELS ET METHODES

### I. 1. Matériels

#### I. 1. 1. Echantillonnage

##### A- Animaux

Nous avons commencé notre travail par des enquêtes réalisées dans plusieurs exploitations de la région afin de déterminer un échantillon de fermes à la fois représentatif de la Wilaya mais aussi ayant un niveau de gestion permettant un suivi à moyen terme. Notre choix s'est arrêté sur trois fermes, deux situées dans la région de Djerma (fermes 01 et 02) et une (03) dans la région de Ain-Yagout. Ces exploitations ont été retenues sur la base des critères suivants :

- L'autorisation des éleveurs de procéder à des prélèvements.
- Les élevages bovins laitiers testés, disposent d'un agrément sanitaire délivré par les services vétérinaires de la Direction des Services Agricoles de la Wilaya (exemple d'agrément et de rapport d'essai du laboratoire vétérinaire régional de Constantine dans l'annexe N 1).
- La présence de vaches laitières saines dans chaque élevage (indemnes de mammites et de maladies contagieuses, notamment de brucellose et tuberculose).
- Les élevages bovins laitiers retenus disposent d'un effectif relativement important (Minimum : 20 vaches).

Les prélèvements ont été effectués dans trois élevages situés dans la région de Batna, à l'Est de l'Algérie, qui comptaient entre 21 et 32 vaches, âgées de 3 à 8 ans, et composés des races suivantes : Pie-noir Frisonne-Holstein et Pie-rouge Montbéliarde importées d'Europe.

- **L'exploitation N°1** compte 21 vaches, il s'agit d'une ferme privée située dans la commune de Djerma, Daïra d'El-Madher, Wilaya de Batna.
- **L'exploitation N°2** compte 25 vaches, il s'agit d'une ferme privée de 32 vaches, située dans la commune de Djerma, Daïra d'El-Madher, Wilaya de Batna.
- **L'exploitation N°3** compte 19 vaches, il s'agit d'une ferme privée de 28 vaches, située dans la commune de Ain Yagout, Daïra de Ain Yagout, Wilaya de Batna.

Le mode d'élevage dans la zone d'étude est de type stabulation libre. Durant la journée, les vaches sont conduites dans un enclos fermé où elles reçoivent une ration à base de sorgho ou de maïs en vert. À l'étable, les vaches sont nourries au foin d'avoine et au concentré. Leur abreuvement est assuré par un réservoir d'eau potable provenant de puits artésiens locaux fréquemment désinfectés.

La traite de lait se fait de façon mécanique dans toutes les exploitations.

### ***B- Lait cru***

65 prélèvements ont été effectués aseptiquement à partir de lait individuel issu des quatre quartiers de la mamelle de chaque vache en lactation, au moment de la traite du matin, au début du mois de juillet 2017.

## **I. 1. 2. Matériels de laboratoire**

### ***A. Matériels utilisés pour l'extraction d'ADN***

- Poste Sécurité Microbiologique classe II : Stérile – VBH (Photo N° 1 : Annexe N° 2).
- Microtubes 1,5 ml Eppendorf.
- Solution de PBS (PBS = Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin).
- Glace pilée.
- Centrifugeuse de bureau (centri-boule) (Photo N° 2 : Annexe N° 2).
- Solution d'éthanol absolu AnalaR NORMAPUR pour analyses.
- Solution d'Isopropanol (Propanol molecular biology grade).
- Eau sans nucléase (RNase/DNase free).
- Gants non poudré jetables.
- Parafilm.

- Pipettes à volume variable (réglable).
- Pointes de pipettes à filtre.
- Vortex (IKA Vortex GENIUS 3) (Photo N° 12 : Annexe N° 2).
- Centrifugeuse de paillasse (Eppendorf mini spin plus).
- Bain marie (Julabo SW 22) (Photo N° 11 : Annexe N° 2).
  
- **2 Kits d'extraction d'ADN** de 50 tests (BioExtract® Column : Cat. N° BEC050) livré avec les composants suivants (Photo N° 18 : Annexe N° 2) :
  - BioExtract® Mini Spin Column
  - Collection tubes
  - Buffer LA
  - Buffer LB (concentré)
  - Protéinase K
  - Carrier RNA (poly A)
  - Buffer W1 (concentré)
  - Buffer W2 (concentré)
  - Buffer EL

### ***B. Matériels utilisés pour la quantification de l'ADN***

- NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) (photo N° 33 : Annexe N°2).
- Microordinateur doté du logiciel ND 8000 2.3.2.
- Micropipette.
- Pointes de pipettes à filtre.
- Echantillon à blanc : solution d'élution EL du kit d'extraction.

### ***C. Matériels utilisés pour la PCR en temps réel***

- Poste Sécurité Microbiologique classe II : Stérile – VBH.
- Plaques optiques de 96 puits avec code barre (Ref : 4306737) (photo N° 38 : Annexe N°2).
- Films Optiques Adhesifs Starter Kit (Ref : 4311971) (photo N° 39 : Annexe N°2).



- Thermocycleur ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems) (photo N° 40 : Annexe N°2).
- Gants non poudrés jetables.
- Pipette (réglable).
- Pointes de pipettes avec filtres.
- Glace pilée.
- Vortex (IKA Vortex GENIUS 3).
- Centrifugeuse de bureau pour les tubes de 2 ml (Eppendorf mini spin plus).
- Centrifugeuse des plaques optiques (Eppendorf Centifuge 5430 R).
- Eau sans nucléase (RNase/DNase free).
  
- **2 Kits de BactoReal® Kit *Brucella* spp.** de 100 tests, référence DVEB02113 livré avec les composants suivants (photo N° 41 : Annexe N°2) :
  - *Brucella* spp Mix Assay (bouchon vert) qui contient Amorces et sondes (FAM) pour la détection de *Brucella* spp
  
  - Mix CR-3 Mix Assay (bouchon jaune) qui contient Amorces et sondes (Cy5) pour la détection de IPC
  
  - Positive control *Brucella* spp (bouchon rouge) qui contient environ 10 000 copies cible/ $\mu$ l comme un Contrôle-DNA
  
  - DNA reaction mix (bouchon blanc) : Mix réactionnel d'ADN contient de uracil-N glycosylase (UNG)
  
  - Water (bouchon bleu) : eau
  
- **2 Kits de BactoReal® Kit *Listeria monocytogenes*** de 100 tests, référence DVEB00813 livré avec les composants suivants :
  - *Listeria monocytogenes* Mix Assay (bouchon vert) qui contient Amorces et sondes (FAM) pour la détection de *Listeria monocytogenes*

- Mix CR-3 Mix Assay (bouchon jaune) qui contient Amorces et sondes (Cy5) pour la détection de IPC

- Positive control *Listeria monocytogenes* (bouchon rouge) qui contient environ 10 000 copies cible/ $\mu$ l comme un Contrôle-DNA

- DNA reaction mix (bouchon blanc) : Mix réactionnel d'ADN contient de uracil-N glycosylase (UNG)

- Water (bouchon bleu) : eau

## **I. 2. Méthodes**

### **I. 2. 1. Prélèvements de lait**

Le lait des quartiers individuels est collecté, dans des flacons en plastique stériles à double emballage (Photo N° 4 : Annexe N°2) et hermétiquement fermés, directement après nettoyage de la mamelle et expulsion des premiers jets de lait. Au cours du prélèvement, le flacon est maintenu aussi horizontalement que possible de l'extrémité du trayon. Le trayeur portait des gants et se désinfectait les mains régulièrement entre chaque vache afin de se prêter au mieux aux bonnes pratiques de traite. Tous les prélèvements ont été identifiés et acheminés à +4°C dans une glacière, au laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) situé à Constantine pour des extractions de l'ADN immédiatement lors de la réception.

## I. 2. 2. Extraction de l'ADN génomique directement sur des échantillons de lait

### A- Préparation de l'ADN bactérien

#### ➤ Prétraitement du lait

Sous hotte PSM, le lait subit un prétraitement comme suit : un tube de 1,5 ml par échantillon à extraire est annoté avec le nom correspondant (Photo N° 5 : Annexe N°2), une prise d'essai (Photo N° 6 : Annexe N°2) de 800 µl de lait est centrifugée pendant 5 minutes à 10 000 g, le surnageant est ensuite éliminé (Photos N° 7, 8 et 9 : Annexe N°2) et le culot est re-suspendu dans 300 µl de PBS (Photo N° 10 : Annexe N°2). : Durant l'extraction, le lait est maintenu dans la glace pilée (Photo N° 3 : Annexe N°2).

#### ➤ Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée grâce à un kit utilisant un protocole basé sur une réaction d'adsorption de l'acide nucléique sur une matrice de silice disposée en colonne, en présence de sels chaotropiques.

Avant d'entamer l'extraction de l'ADN, le "carrier RNA" est reconstitué et aliquoté à – 20°C (Photo N° 13 : Annexe N°2), et les tampons LB, W1 et W2 sont préparés comme suit :

- 310 µl de Buffer EL sont ajoutés dans le flacon "carrier RNA".
- 8 ml d'isopropanol pur (100%) sont ajoutés dans le flacon Buffer LB.
- 25 ml d'éthanol pur (96 – 100%) sont ajoutés dans le flacon Buffer W1.
- 40 ml d'éthanol pur (96 – 100%) sont ajoutés dans le flacon Buffer W2.

Le protocole d'extraction suit les recommandations du fabricant (Figure N° 5), avec quelques modifications.

La solution de lyse LA-carrier est préparée avec un volume de 10% supérieur à celui requis pour le nombre total d'échantillons à purifier afin de compenser les erreurs de pipetages et est aliquoté à – 20°C (Photo N° 15 : Annexe N°2). Le volume de solution de lyse LA-carrier en excès doit être jeté. Les volumes sont ajustés en fonction du nombre

d'échantillons : les volumes indiqués pour 1 échantillon sont multipliés par le nombre d'échantillon à traiter puis sont multipliés par 1,1.

Les volumes indiqués pour 1 échantillon sont 1µl de carrier RNA (1µg/µl) est ajouté à 100 µl de Buffer LA (Photo N° 14 : Annexe N°2).

L'extraction est réalisée en quatre étapes :

- **Lyse et ajustement des conditions d'adsorption**

20 µl de protéinase K (Photo N° 16 : Annexe N°2) sont déposés dans un tube de 1,5 ml; puis 200 µl d'échantillon (Photo N° 17 : Annexe N°2) sont ajoutés à la protéinase K ; et enfin, 100 µl de solution de lyse LA-carrier sont ajoutés. Le mélange est vortexé puis incubé pendant 15 min à température ambiante. Après incubation, le mélange est centrifugé brièvement par une centri-boule, puis 350 µl de Buffer LB sont ajoutés au mélange puis vortexé et centrifugé brièvement.

- **Adsorption sur la membrane de silice**

La totalité du volume est transférée délicatement dans la colonne BioExtract® Mini Spin Column qui est placée dans un tube collecteur de 2 ml (Photo N° 19 : Annexe N°2), puis centrifugée à 6 000g pendant 1 min. La colonne BioExtract® Mini Spin Column est mise dans un nouveau tube collecteur et le tube collecteur contenant le filtrat est jeté.

- **Lavage et séchage de la membrane de silice**
















600 µl de Buffer W1 (Photo N° 20 : Annexe N°2) sont transférés dans la colonne qui est alors centrifugée à 6 000 x g pendant 1 min. Le tube collecteur est de nouveau changé, puis 600 µl de Buffer W2 (Photo N° 21 : Annexe N°2) sont ajoutés à la colonne puis centrifugés à 6 000 x g aussi pendant 1 min, et à nouveau le tube collecteur est changé. Une centrifugation à 20 000 x g pendant 2 min est réalisée pour sécher la membrane (Photo N° 22 : Annexe N°2).

- **Elution des acides nucléiques**

La colonne BioExtract<sup>®</sup> Mini Spin Column est mise dans un nouveau tube de 1,5 ml et le tube collecteur contenant le filtrat est jeté. 50 µl de Buffer EL sont ajoutés délicatement au centre de la membrane (Photo N° 23 : Annexe N°2). Après incubation à température ambiante pendant 1 min, il est procédé à une centrifugation à 20 000 x g pendant 1 min (Photo N° 24 : Annexe N°2), puis la colonne est jetée (Photo N° 25 : Annexe N°2) et le tube de 1,5 ml (Photo N° 26 : Annexe N°2) est fermé par un parafilm (Photo N° 27 : Annexe N°2) et conservé à – 20°C.

Au cours de l'extraction, un échantillon "contrôle négatif" a été inclus afin de valider l'absence d'inter-contamination des échantillons lors de l'extraction. L'échantillon est remplacé par de l'eau (RNase/DNase free) et traité en parallèle des échantillons.



<p>1</p> <p>Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption</p>	 <p>20 µl de protéinase K 200 µl d'échantillon 100 µl de solution de lyse LA-carrier (Pour 1 : 100 µl Buffer LA / 1 µl carrier RNA / 5 µl IPC exogène)</p> <p>Température ambiante (TA) 15 min</p> <p>350 µl de Buffer LB</p>									
<p>2</p> <p>Adsorption sur la membrane de silice</p>	 <p>Charger la colonne BioExtract® Mini Spin Column délicatement</p> <p> 6 000 x g 1 min</p>									
<p>3</p> <p>Lavages</p> <p>Séchage de la membrane de silice</p>	 <table border="0"> <tbody> <tr> <td>1<sup>er</sup> Lavage</td> <td>600 µl W1</td> <td> 6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>2<sup>nd</sup> Lavage</td> <td>600 µl W2</td> <td> 6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>-</td> <td> 20 000 x g 2 min</td> </tr> </tbody> </table>	1 <sup>er</sup> Lavage	600 µl W1	 6 000 x g 1 min	2 <sup>nd</sup> Lavage	600 µl W2	 6 000 x g 1 min	-	-	 20 000 x g 2 min
1 <sup>er</sup> Lavage	600 µl W1	 6 000 x g 1 min								
2 <sup>nd</sup> Lavage	600 µl W2	 6 000 x g 1 min								
-	-	 20 000 x g 2 min								
<p>4</p> <p>Elution des acides nucléiques</p>	 <p>50-100 µl de Buffer EL* (TA) délicatement</p> <p>TA 1 min</p> <p> 20 000 x g 1 min</p>									

**Figure N° 5 : Protocole simplifié d'extraction de l'ADN**

➤ **Optimisation du protocole d'extraction de l'ADN**

Pour certains échantillons, notamment ceux qui sont de concentration d'ADN inférieures à 10 ng/µl, l'extraction a été réalisée de nouveau après optimisation du protocole, afin d'augmenter la concentration de l'ADN extrait.

L'optimisation a concerné d'abord le prétraitement du lait, par l'augmentation de la quantité de la prise d'essai à 1200 µl de lait qui sont centrifugés pendant 7 minutes à 10 000 g, puis le surnageant est éliminé et le culot est re-suspendu dans 450 µl de PBS.

Puis, le mélange contenant 20 µl de protéinase K, 200 µl d'échantillon et 100 µl de solution de lyse LA-carrier est vortexé et incubé pendant 40 min à température ambiante.

Lors de l'étape de l'élution, la quantité de Buffer EL utilisée est diminuée à 30 µl au lieu de 50 µl auparavant.

Après la dernière centrifugation, 1µl d'ARNase est ajouté aux tubes de 1,5 ml (photo N° 28 : Annexe N°2), puis incubé pendant 30 min dans un bain marie à 37°C (photo N° 29 : Annexe N°2). Après centrifugation à 2 000 x g pendant 2 min les tubes sont fermés avec un parafilm et conservés à -20 °C avant leur utilisation (photo N° 31 : Annexe N°2).

Les échantillons ayant une concentration d'ADN supérieure à 10 ng/µl, et dont le rapport de la DO A260/A280 est plus de 2, sont soumis uniquement à l'action de l'ARNase.

### ***B- Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN extrait obtenue par spectrophotométrie***

La quantité et la qualité d'ADN extrait (photo N° 30 : Annexe N°2) ont été mesurées par spectrophotométrie avec le NanoDrop 8000, par la mesure de l'absorbance de l'échantillon en lumière ultraviolette à 230, 260 et 280 nm. La concentration d'ADN est déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé « blanc ».

Les protéines et les acides nucléiques absorbent la lumière dans la plage des ultraviolets dans des longueurs d'onde comprises entre 210 et 300 nm.

\* L'absorbance maximale de solutions ADN est fixée à 260 nm ( $DO_{260}$ ). Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à :

- Une solution d'ADN double brin à 50  $\mu\text{g/ml}$
- Une solution d'ADN simple brin à 37  $\mu\text{g/ml}$

La quantité d'ADN total contenu dans l'échantillon sera alors égale à  $50 \times DO_{260}$   $\mu\text{g/ml}$  pour l'ADN double brin ou à  $37 \times DO_{260}$   $\mu\text{g/ml}$  pour l'ADN simple brin.

\* L'absorbance maximale de solutions à base de protéines est de 280 nm ( $DO_{280}$ ), alors que les solvants ou les sels chaotropiques (utilisés dans l'extraction des acides nucléiques) absorbent idéalement dans l'UV à 230 nm ( $DO_{230}$ ) (Manchester, 1996).

Dès lors, les solutions d'ADN absorbent partiellement la lumière à 280 nm, tandis que les solutions de protéines l'absorbent partiellement à 260 nm. Le ratio entre les valeurs à 260 nm et à 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) (DO) fournit une estimation du degré de pureté d'une solution d'ADN. Ainsi, le rapport  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  constitue un moyen d'apprécier une éventuelle contamination de la solution d'ADN :

- Un rapport compris entre 1,8 et 2 correspond à une solution pure d'ADN ;
- Un rapport inférieur à 1,7 est le signe d'une contamination par des protéines ;
- Un rapport supérieur à 2 est le signe d'une contamination par l'ARN (Hammani, 2017).

La spectrophotométrie UV des extraits d'ADN a été réalisée grâce à un NanoDrop relié à un microordinateur doté du logiciel ND 8000 2.3.2 (photo N° 32 : Annexe N°2).

Avant de mesurer la quantité d'ADN extraite, les surfaces supérieures et inférieures de spectrophotomètre sont nettoyées par pipetage de 2 à 3  $\mu\text{l}$  d'eau déminéralisée propre sur la surface inférieure optique.

Le bras du levier est abaissé, pour assurer que le piédestal supérieur vient en contact avec l'eau déminéralisée. Puis, le bras du levier est soulevé et les surfaces optiques sont essuyées avec un papier absorbant (photo N° 35 : Annexe N°2).

Après ouverture du logiciel NanoDrop, l'application des acides nucléiques est sélectionnée. Un petit volume est utilisé, grâce à une pipette calibrée pour effectuer un essai à blanc (photo N° 34 : Annexe N°2) en déposant 1 µl de tampon EL sur la surface inférieure optique. Le bras du levier est abaissé et sélectionner l'application des **acides nucléiques**, l'option "**Vierge**" dans le logiciel d'application.

Une fois l'essai à blanc terminé, les deux surfaces optiques sont nettoyées avec un papier absorbant.

La constante 50 est choisie pour **calculer la concentration d'ADN** double brin de l'échantillon à tester.

1 µl d'échantillon d'ADN est déposé sur la partie inférieure du piédestal optique (photo N° 36 : Annexe N°2) puis le bras du levier est abaissé (photo N° 37 : Annexe N°2), car la mesure est indépendante du volume, l'échantillon a seulement besoin de combler le fossé entre les deux surfaces optiques pour une mesure à prendre.

Sélectionner la fonction "mesure" dans le logiciel d'application. Les mesures d'absorbance, la quantité de l'ADN et les différents rapports de densités optiques sont directement obtenus grâce au logiciel ND 8000 2.3.2. Entre deux échantillons, les 2 surfaces de mesures sont soigneusement essuyées à l'aide de papier absorbant.

### I. 2. 3. PCR en temps réel

Cette expérience consiste en la détection de *L. monocytogenes* et des *Brucella spp.* directement dans des échantillons de lait cru par une méthode de biologie moléculaire, au moyen de la technique d'amplification des gènes ou PCR en temps réel. Cette méthode présente des avantages de sensibilité, spécificité et rapidité par rapport à la PCR conventionnelle. Les principales étapes de cette expérience sont :

A- Amplification du gène IS711 par PCR en temps réel : pour la détection de *Brucella spp.*

B- Amplification du gène *hlyA* par PCR en temps réel : pour la détection de *L. monocytogenes*.

#### **A- Amplification du gène IS711 par PCR en temps réel (détection de *Brucella spp.*)**

Afin d'éviter des difficultés d'analyse bactériologique, des techniques de biologie moléculaire, souvent basées sur l'amplification par la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR), sont utilisées avec succès dans l'identification et le typage des *Brucella* (Yu et Nielsen, 2010).

#### **\* Description du kit utilisé**

Nous avons choisi de travailler avec la technologie des sondes fluorescentes en utilisant le Kit BactoReal® *Brucella spp.* qui détecte une insertion de la séquence IS711 des espèces : *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis* et *B. suis*. IS711 est caractéristique de *Brucella spp.* et apparaît en nombre variable (5-38 copies) (kit manufacturers BactoReal® Kit *Brucella spp.*, 2014).

Ce Kit a été développé et validé par ABI PRISM® 7500 (Fast) instrument (Applied Biosystems. France), il permet la détection rapide et sensible de l'ADN de *Brucella spp.* à partir d'échantillons purifiés de lait.

Un contrôle positif interne au système pour la détection en Cy5 (667 nm) permet de mettre en évidence les inhibitions de la PCR entraînant des résultats faux négatifs lors de l'interprétation des résultats due à l'inhibition de la PCR en temps réel.

Avant de commencer la PCR en temps réel, la hotte et les Pipettes sont décontaminées régulièrement avec de l'alcool. Puis tous les composants du kit sont décongelés à température ambiante. Une fois décongelés, les composants sont agités et centrifugés brièvement.

Les cycles répétés de congélation/décongélation sont évités et les composants du kit sont protégés de la lumière.

#### **\*Préparation de mélange réactionnel :**

Le mélange réactionnel de 20  $\mu$ l est composé de :

- 5  $\mu$ l d'échantillon (ou ADN génomique) contenant de l'ADN de matrice (photo N° 44, 45 : Annexe N°2),
- et de 15 $\mu$ l de Master Mix (photo N° 42 : Annexe N°2), composé de 3.0  $\mu$ l d'eau (Water), 10  $\mu$ l de DNA Mix reaction (Mix réactionnel d'ADN), 1 $\mu$ l de *Brucella* Mix Assay (Amorces et sondes (FAM) pour la détection de *Brucella* spp) et 1 $\mu$ l de CR-3 Mix Assay (Amorces et sondes (Cy5) pour la détection de IPC).

Il faut s'assurer d'avoir au moins un contrôle négatif (eau sans nucléase), un contrôle positif (Contrôle-DNA (environ 10 000 copies cible/ $\mu$ l) et une extraction négative (extraction de l'eau à la place de l'échantillon) inclus par PCR, pour valider l'interprétation des résultats.

**\* Pour le Contrôle Négatif:** 5  $\mu$ l d'eau sont utilisés sans nucléase à la place de l'échantillon.

**\* Pour le Contrôle Positif:** 1  $\mu$ l de *Brucella abortus* est utilisé comme contrôle positif + 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

\* une dilution au 1 :10 du contrôle positif est utilisée et définie comme une seconde valeur standard (environ 1000 copies cibles/ $\mu$ l), afin de comparer nos résultats même avec une quantité faible d'ADN.

Les échantillons positifs (prélèvements, contrôles et amplicons) sont stockés et extraits du congélateur séparément des autres réactifs et sont ajoutés au mix réactionnel en dernier pour éviter toute contamination.

Selon les recommandations du fabricant toutes les analyses PCR sont faites en duplicate afin d'optimiser la probabilité de détecter des pathogènes et faciliter l'interprétation de résultats.

La plaque ainsi préparée est couverte par un film optique adhésif (photo N° 46, 47) et positionnée dans une centrifugeuse (photo N° 48) pour une brève centrifugation pour faire descendre toutes les gouttelettes se trouvant sur la paroi des puits de la plaque, puis positionnée dans un thermocycleur (photo N° 51) préalablement chauffé à 50°C. Le thermocycleur est programmé pour une PCR en temps réel comme suite :

- désignation d'une nouvelle expérience ;
- définition du matériel et méthodes ;
- définition des amorces et sondes utilisées ;
- programmation des échantillons et contrôles (photo N° 49).

**\* Programmation du profil de température** (photo N° 50)

La réaction a été effectuée à une température de dénaturation préliminaire de l'ADN en 20 sec à 95°C, suivie de 45 cycles consistant en 5 sec à 95°C pour la dénaturation de l'ADN, et 1 min à 60°C pour l'extension d'amorce à médiation de polymérase.

**\* Finalement, le démarrage de thermocycleur est obtenu par un clic sur le Botton "Run".**

Les paramètres pour une quantification sont :

- **Détecteurs:**
  - **FAM-TAMRA** pour la détection de *Brucella*
  - **Cy5-NONE** pour la détection du contrôle positif interne (Mix CR-3)
  
- **Référence Passive: ROX**

Selon le fabricant, pour valider une interprétation (tableau N° 10), les critères suivant doivent être remplis:



**Tableau N° 10 : Les critères pour valider une interprétation de la détection de *Brucella* (fabricant du Kit BactoReal® Kit *Brucella* spp., 2014),**

	Ct/Cp (FAM) <i>Brucella</i> cible	Ct/Cp IPC cible	Interprétation
Contrôle négatif	Négatif	36.0 ± 2	Validé
Contrôle positif (non dilué, 1 µl/PCR)	30.0-33.0	36.0 ± 2	Validé
Ou : Contrôle positif (dilué au 1:10, 1µl/PCR)	33.0-36.0	36.0 ± 2	Validé
Contrôle négatif d'extraction	Négatif	36.0 ± 2	Validé
Echantillon négatif	Négatif	36.0 ± 2	Validé
Echantillon positif	Positif	Positif/Négatif	Validé

**Ct** = Cycle Threshold : Valeur à laquelle la courbe PCR croise le seuil.

Un échantillon est considéré comme positif si le seuil du cycle (Ct) est  $\leq 40$  (Al Dahouk *et al.*, 2007) en deux séries d'examen.

Lorsque l'analyse est terminée, les résultats sont soit :

### 1. Signal dans FAM :

- L'ADN de *Brucella* spp a été amplifié. L'échantillon doit être interprété comme **positif**.
- La présence d'amplification pour *Brucella* spp peut entraîner une réduction ou une absence du signal de fluorescence du contrôle positif interne (compétition de la PCR).

### 2. Pas de signal dans FAM :

- Aucun ADN de *Brucella* spp détecté dans l'échantillon. L'échantillon doit être interprété comme **négatif**.

**B- Amplification du gène *hlyA* par PCR en temps réel (la détection de *L. monocytogenes*)**

Nous avons choisi de travailler avec la même marque du Kit en utilisant BactoReal® Kit *Listeria monocytogenes* (référence DVEB00813) qui détecte le gène *hlyA* de *L. monocytogenes* à l'aide d'une sonde spécifique marquée par le fluorophore FAM (530 nm) (kit manufacturer's BactoReal® Kit *Listeria monocytogenes*, 2015).

Ce Kit a été développé et validé aussi sur ABI PRISM® 7500 (Fast) instrument (Applied Biosystems), il permet la détection rapide et sensible de l'ADN de *L. monocytogenes* à partir d'échantillons purifiés de lait.

Un contrôle positif interne au système pour la détection dans Cy5 (667 nm) exclut l'interprétation de faux négatifs causée par l'inhibition de la PCR en temps réel.

La méthode pour l'amplification du gène *hlyA* de *L. monocytogenes* par PCR en temps réel est la même que celle utilisée pour l'amplification du gène *IS711* de *Brucella* spp par PCR en temps réel.

L'ADN utilisé pour la préparation du mélange réactionnel dans le cas de *L. monocytogenes* est le même ADN extrait auparavant, parce qu'on prélève seulement 5µl de l'ADN.

La même méthode de préparation du mélange réactionnel, de désignation d'une nouvelle expérience, de définition du matériel et méthodes, de définition des amorces et sondes utilisées, de programmation des échantillons et contrôles, de programmation du profil thermique et de démarrage de routine sont utilisés.

La seule différence réside dans le tableau d'interprétation des résultats PCR (tableau N° 11) où le Ct de contrôle positif non dilué est **28.0 – 31.0** au lieu de 30.0 – 33.0 et le Ct de contrôle positif dilué est **31.0 – 34.0** au lieu de 33.0 – 36.0.

**Tableau N° 11 : Les critères pour valider une interprétation de la détection de *Listeria monocytogenes* (fabricant du Kit BactoReal® Kit *Listeria monocytogenes*, 2015),**

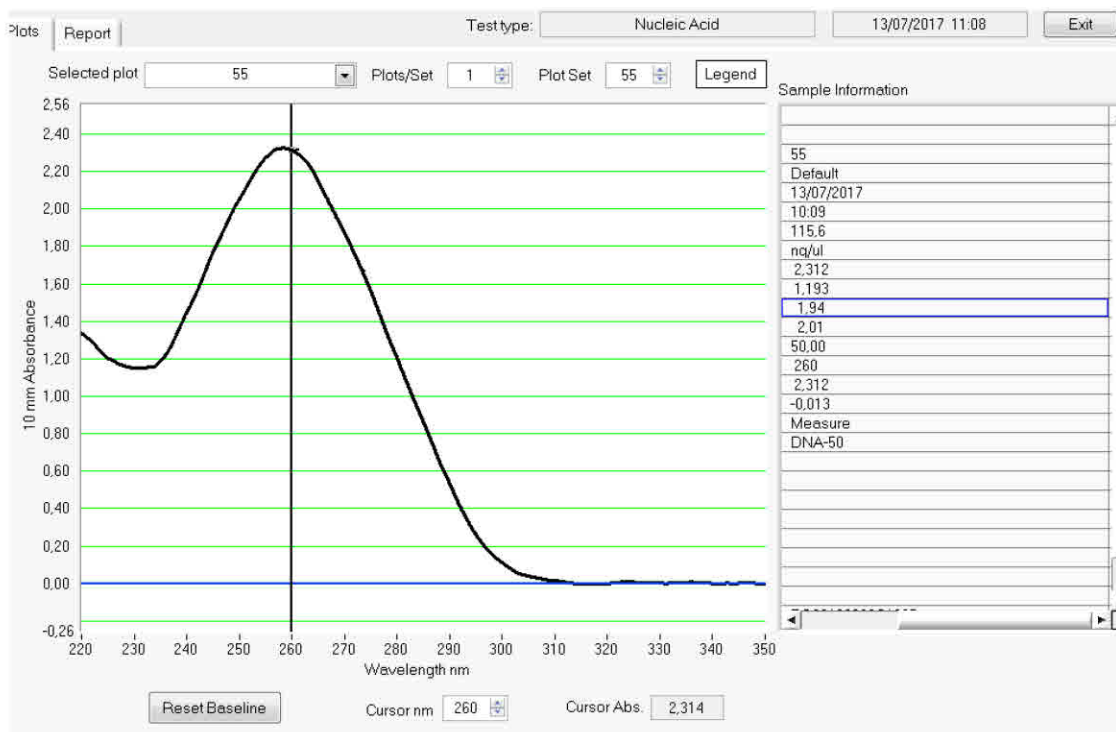
	<b>Ct/Cp (FAM)</b> <i>L. monocytogenes</i> cible	<b>Ct/Cp</b> IPC cible	Interprétation
Contrôle négatif	Négatif	36.0 ± 2	Validé
Contrôle positif (non dilué, 1 µl/PCR)	28.0-31.0	36.0 ± 2	Validé
Ou : Contrôle positif (dilué au 1:10, 1µl/PCR)	31.0-34.0	36.0 ± 2	Validé
Contrôle négatif d'extraction	Négatif	36.0 ± 2	Validé
Echantillon négatif	Négatif	36.0 ± 2	Validé
Echantillon positif	Positif	Positif/Négatif	Validé

La même procédure d'interprétation des résultats par rapport au signal dans FAM est utilisée.

## II. RESULTATS

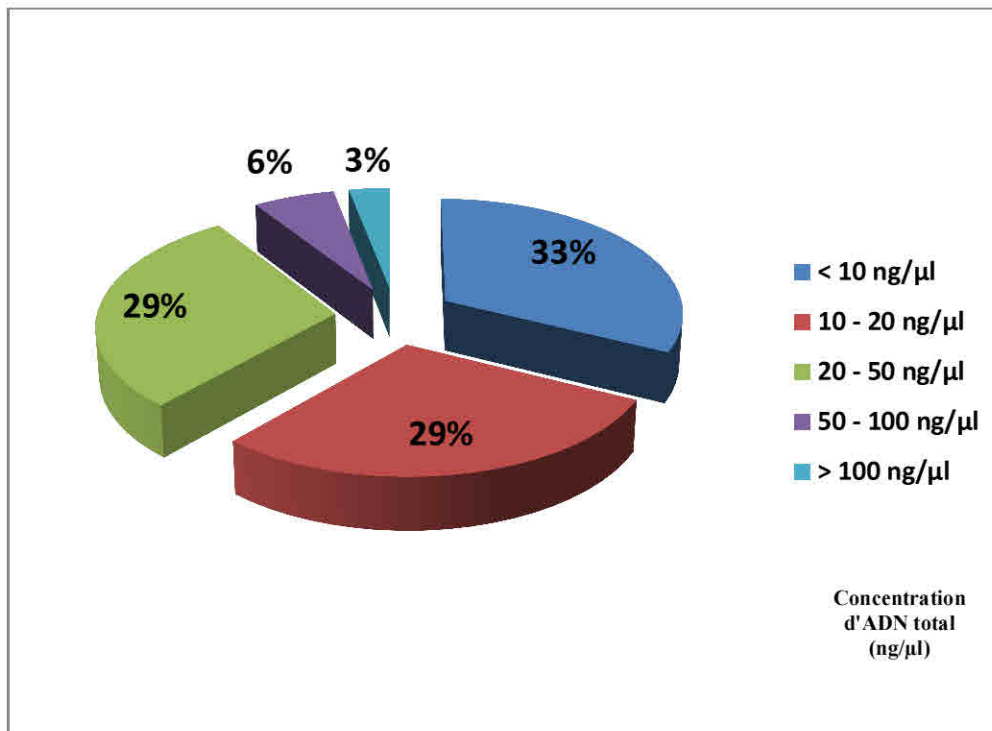
### II. 1. Quantification et controle de la purete de l'ADN extrait obtenue par spectrophotometrie

Les résultats des mesures d'absorbance, la quantité de l'ADN total extrait des échantillons de lait cru et les différents rapports de densités optiques sont présentés dans le tableau N° 12 (Annexe N° 3).



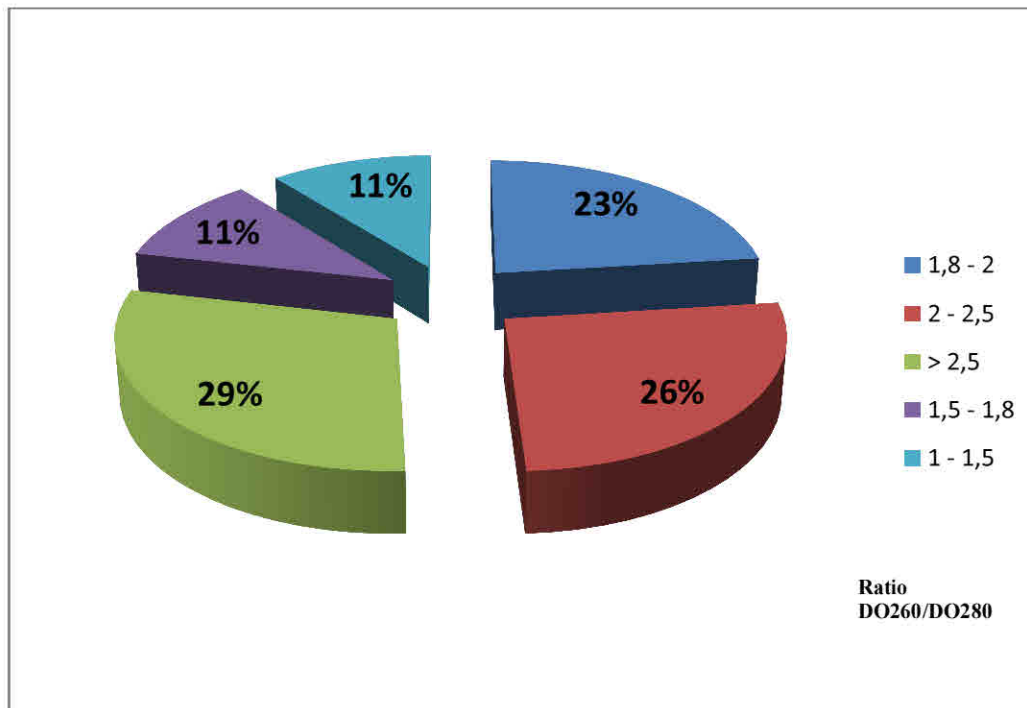
**Figure N° 6 : Résultat type de lecture sur NanoDrop de l'échantillon N°55**

Les résultats montrent des niveaux de concentration d'ADN extrait et de sa contamination variables (Figures 7, 8 et 9), et permettent une meilleure lecture des résultats figurant dans le tableau N° 12 (Annexe N° 3).



**Figure N° 7 : Répartition des concentrations en ADN totaux extraits à partir des échantillons de lait**

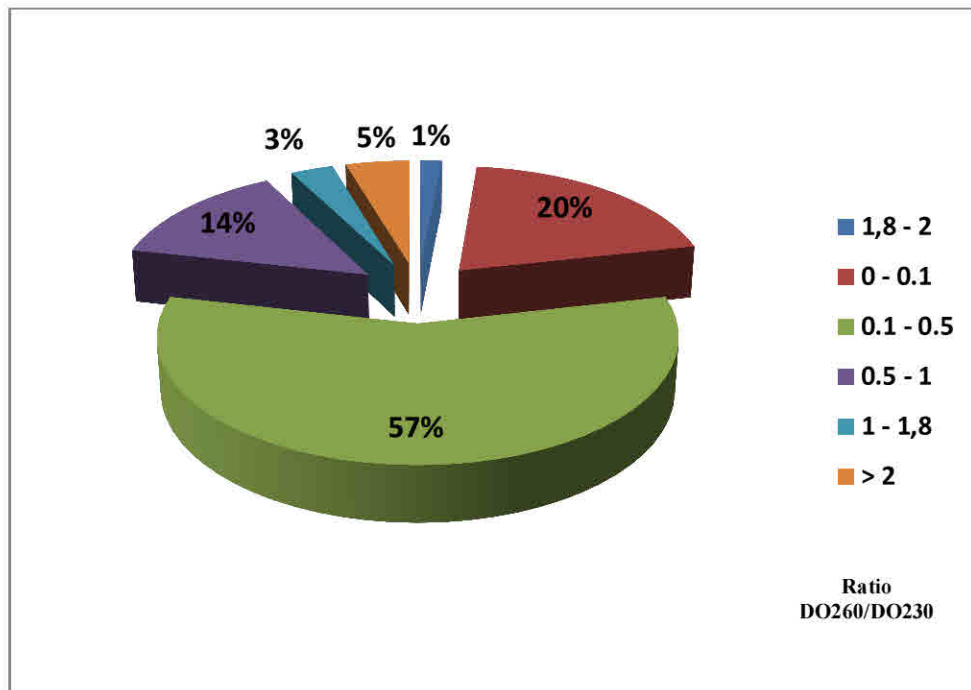
Les résultats obtenus (Figure N° 7) montrent que 33% des échantillons contiennent une faible quantité d'ADN, correspondant à une concentration d'ADN inférieure à 10 ng/μl. Un pourcentage similaire d'échantillons soit 29% présentent des concentrations en ADN comprises entre 10 et 20 ng/μl et 20 à 50 ng/μl. Seuls 6% des échantillons présentent une concentration en ADN comprise entre 50 et 100 ng/μl, et enfin 3% uniquement des échantillons présentent une concentration en ADN supérieure à 100 ng/μl.



**Figure N° 8 : Répartition des ratios  $DO_{260}/DO_{280}$  représentant le niveau de contamination des extraits d'ADN par les protéines**

Les résultats montrent que seuls 23% des échantillons présentent des extraits d'ADN purs (Figure N° 8), c'est-à-dire non contaminés par les protéines. 11% des échantillons sont faiblement contaminés par les protéines, ce sont ceux présentant un Ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  compris entre 1,5 et 1,8. 11% des échantillons sont contaminés par les protéines, leur Ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  varie entre 1 et 1,5. Il est à signaler que le niveau de contamination des extraits d'ADN par les protéines est faible pour la totalité des échantillons puisque leur Ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  est  $\geq 1$ .

Par contre, le niveau de contamination des extraits d'ADN par l'ARN est généralement fort. Ainsi, 26% des échantillons sont faiblement contaminés par l'ARN, leur Ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  est compris entre 2 et 2,5 ; et 29% des échantillons sont fortement contaminés par l'ARN, ceux présentant un Ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  supérieur à 2,5 (Figure N° 8).



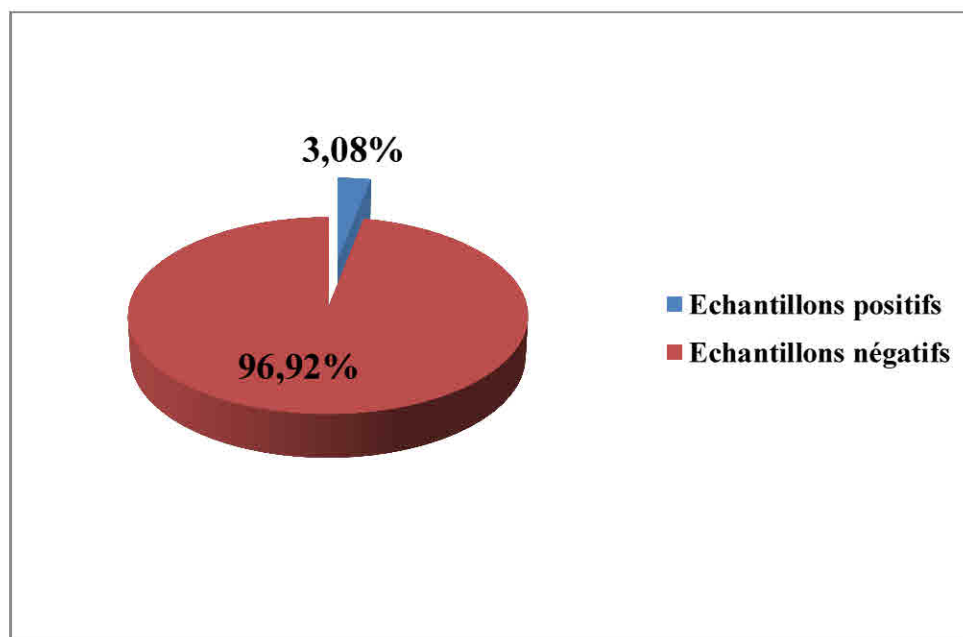
**Figure N° 9 : Répartition des ratios  $DO_{260}/DO_{230}$  présentant le niveau de contamination des extraits d'ADN par les sels chaotropiques**

Presque tous les échantillons ont montré un ratio  $DO_{260}/DO_{230}$  inférieur à 1,8 ; ce qui confirme le niveau de contamination des extraits d'ADN par les sels chaotropiques. Un seul échantillon est pur, 3% ont un faible niveau de contamination, leur ratio  $DO_{260}/DO_{230}$  est compris entre 1 et 1,8 ; et 20% sont fortement contaminés avec un ratio  $DO_{260}/DO_{230}$  compris entre 0 et 0,1 (Figure N° 9).



## II. 2. Amplification du gène IS711 par PCR en temps réel (Détection de *Brucella* spp.)

Tous les extraits d'ADN ont fait l'objet d'une amplification génique d'ADN, que ce soit les prélèvements avec un ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  inférieur à 1,8 ; supérieur à 2 ou ceux présentant une concentration d'ADN inférieure à 10 ng/ $\mu$ l. La limite de détection la plus faible obtenue par la technique de PCR en Temps Réel IS711 à 2 fg d'ADN à partir des ADN de *B. abortus* est rapportée par l'étude de Bounaadja (2010).



**Figure N° 10 : Résultats obtenus après amplification du gène IS711 par PCR en temps réel**

Les résultats (Figure N° 10) montrent que sur les 65 échantillons d'ADN testés, 2 (3,08 %) étaient positifs pour l'infection à *Brucella* tandis que 63 (96,92 %) étaient négatifs pour la brucellose, sur la base du test de PCR en temps réel utilisé.

Les échantillons positifs sont les échantillons N° 1 et N° 13.

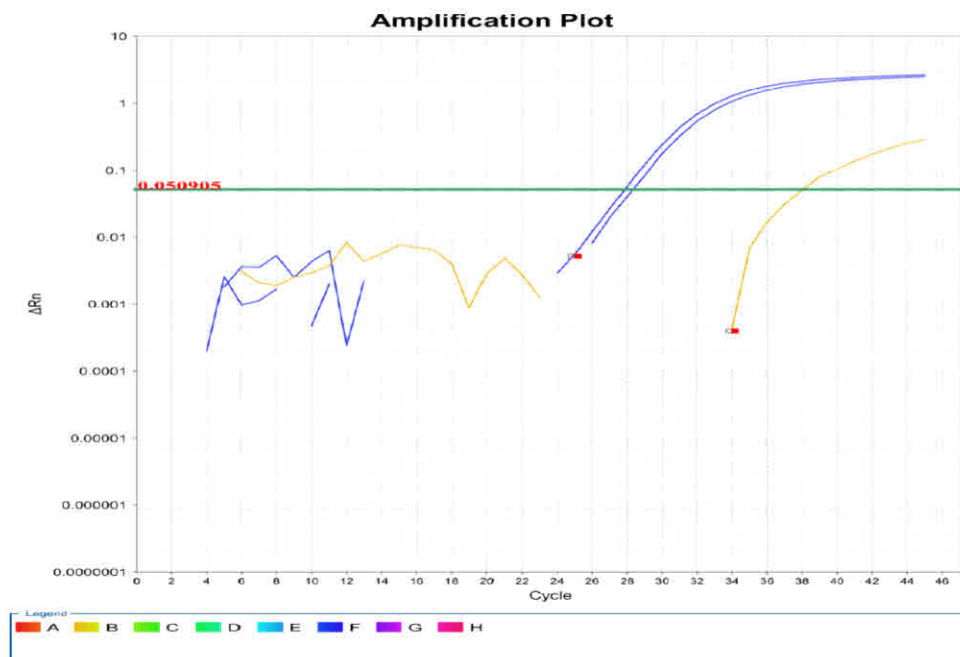


Figure N° 11 : Courbes logarithmiques d'amplification de l'un des 2 échantillons positifs et des deux contrôles positifs (Signal FAM seulement)

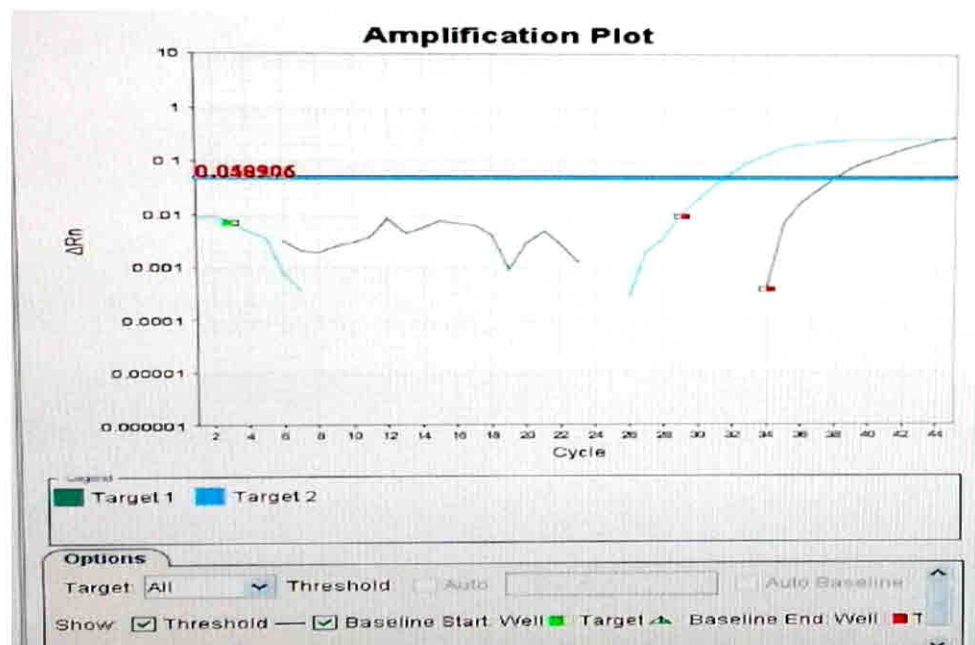
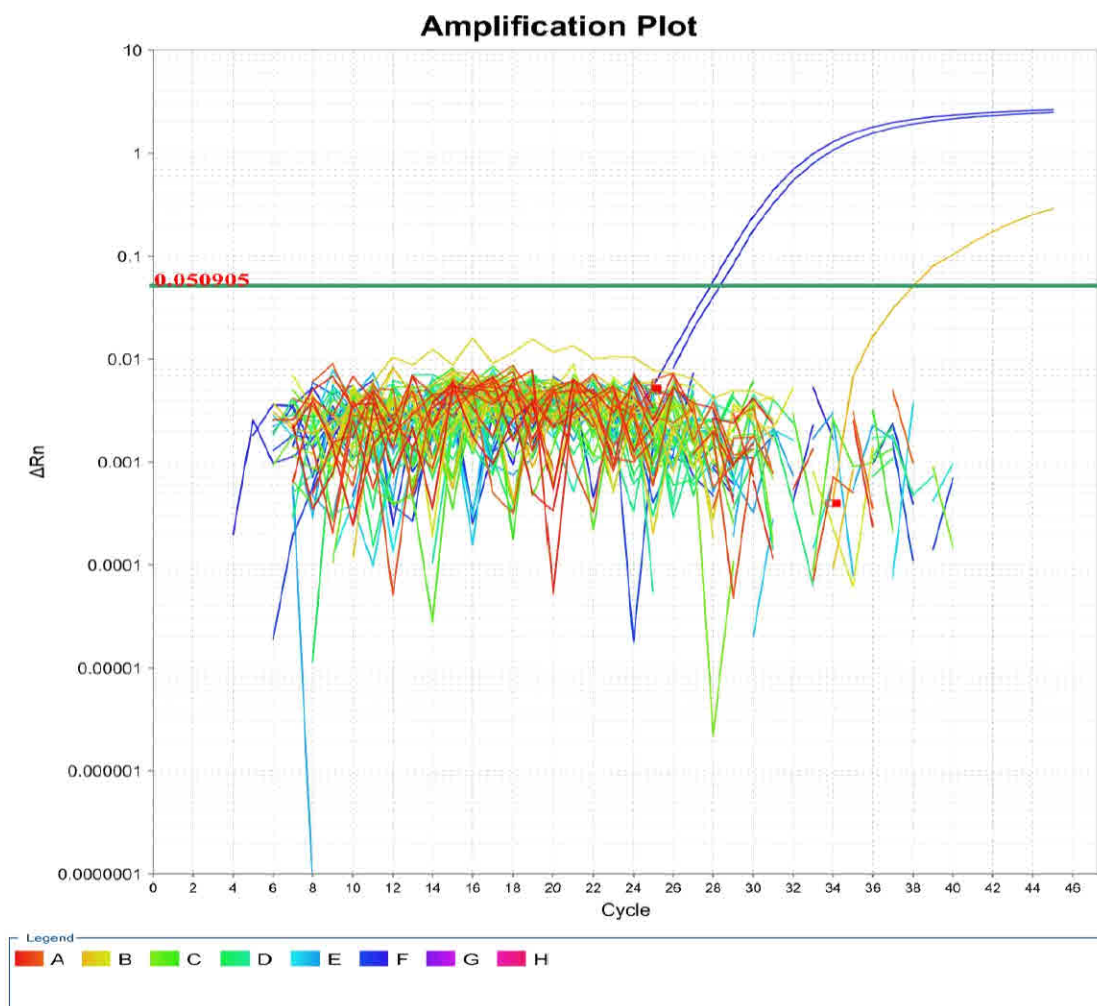


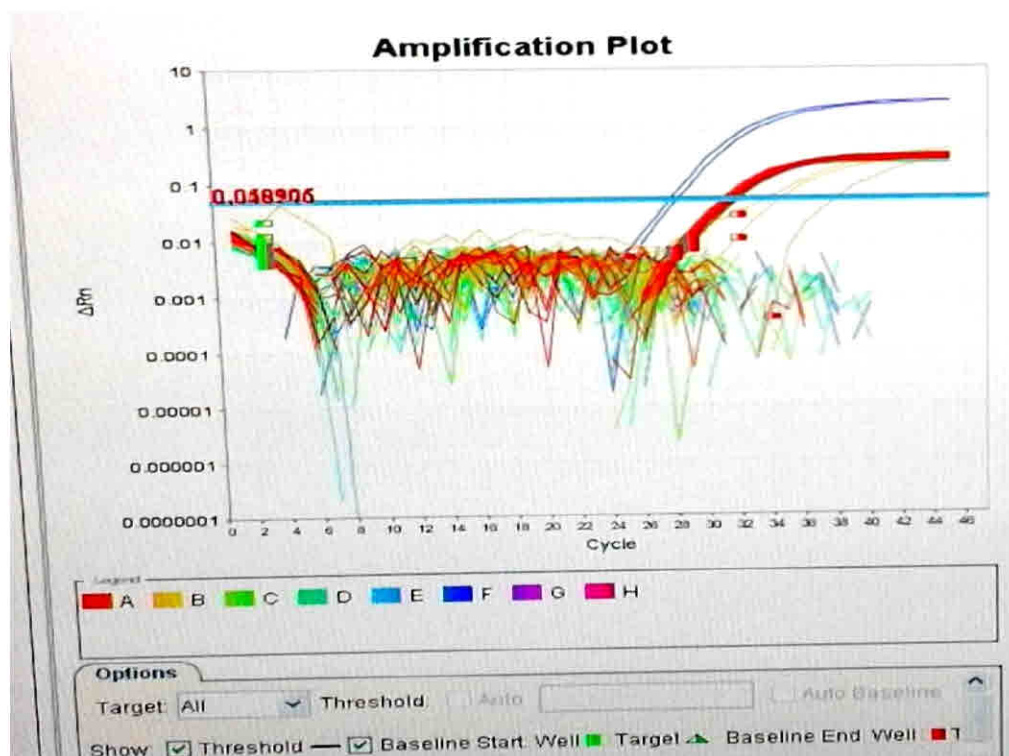
Figure N° 12 : Courbe logarithmique d'amplification de l'un des 2 échantillons positifs

L'axe de fluorescence est logarithmique et le bruit de fond a été préalablement soustrait des données par le logiciel, le Ct Threshold pour le signal FAM est de 0,050905.

Les résultats montrent une multiplication de Target 1 (Signal FAM), ce qui signifie que l'ADN de *Brucella* spp a été amplifié et l'échantillon est interprété positif. Cependant le Ct est de 37.97 ce qui suggère que la présence de *Brucella* spp. est en faible quantité (Figures N° 11 et 12).

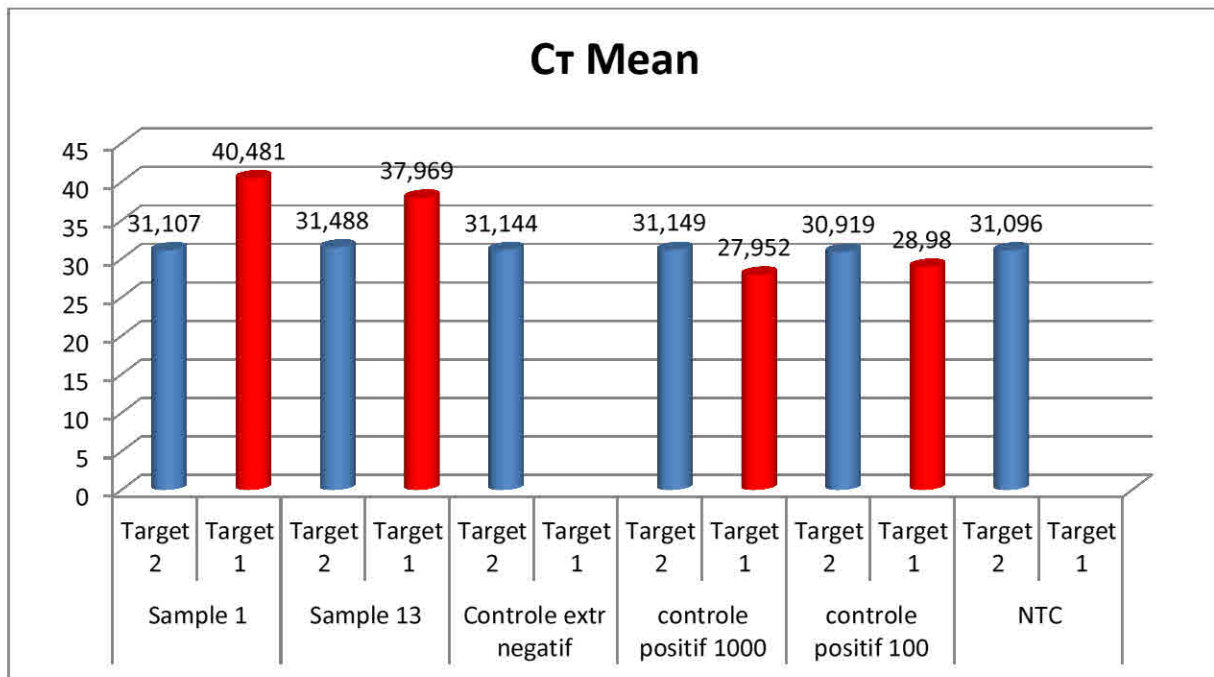


**Figure N° 13 : Courbes logarithmiques d'amplification de l'échantillon positif, contrôles positifs, négatifs et échantillons négatifs inclus (Signal FAM seulement)**



**Figure N° 14 : Courbe logarithmique d'amplification de l'échantillon positif (contrôles positifs, négatifs et échantillons négatifs inclus)**

Les résultats (Figures N° 13 et 14) montrent une multiplication de Target 1 (FAM) pour les contrôles positifs (non dilué et dilué), ainsi que pour l'échantillon positif. Pour les autres échantillons la multiplication de Target 1 n'est pas détectable (en-dessous de la valeur seuil). Les courbes au-dessus de la valeur seuil correspondent à des multiplications de Target 2 (Cy5) de CPI.



**Figure N° 15 : Différentes valeurs de Ct des deux échantillons positifs et des contrôles positifs et négatifs**

Pour les deux échantillons positifs, le Target 2 (CPI) est de 31 au lieu de  $36,0 \pm 2$  ce qui représente une réduction du signal de fluorescence du contrôle positif interne (compétition de la PCR) lors de la présence d'amplification pour *Brucella* spp.

Les valeurs Ct de l'amplification de l'IS711 par la PCR en temps réel des échantillons positifs obtenues étaient de 37,97 et de 40,48 (Figure N° 15).

### II. 3. Amplification du gène *hlyA* par PCR en temps réel (Détection de *L. monocytogenes*)

De la même manière que pour la PCR en temps réel IS711, tous les extraits d'ADN ont fait l'objet d'une amplification du gène *hly A*. Les résultats obtenus sont négatifs pour tous les échantillons testés, la prévalence de *L. monocytogenes* dans les 65 échantillons collectés dans cette étude est de 0%.

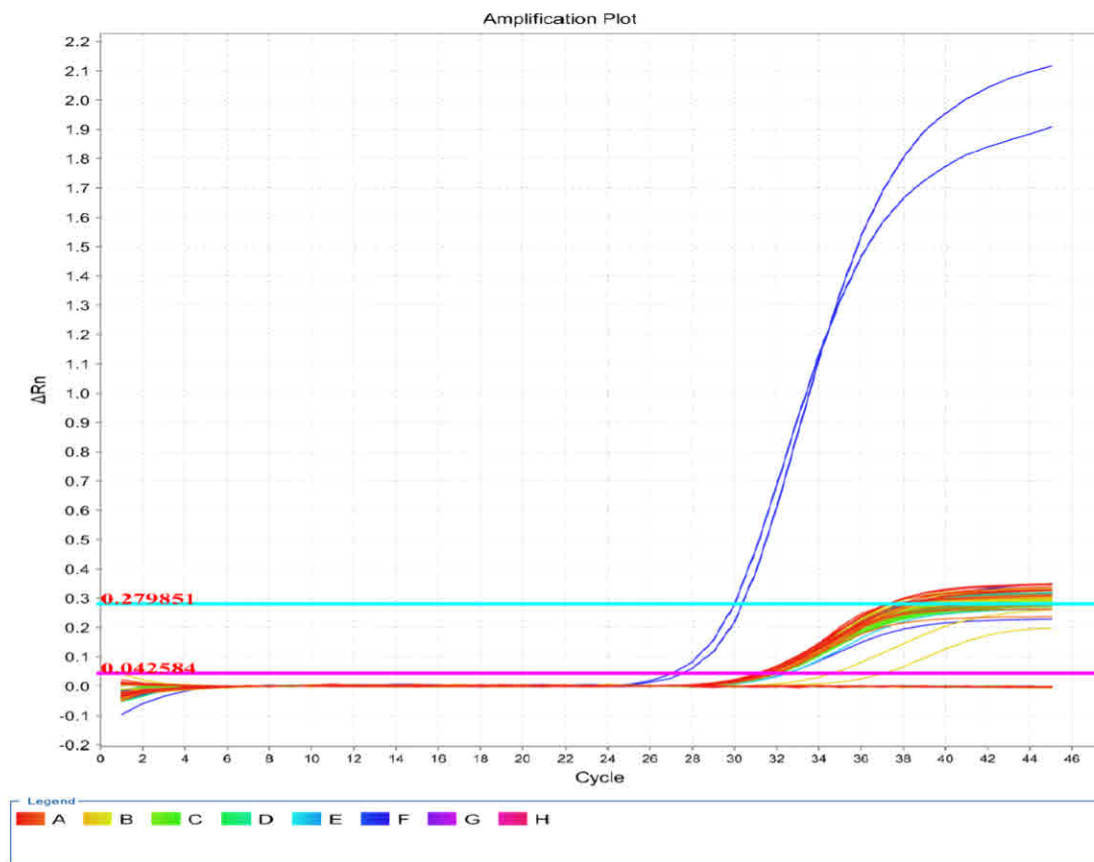
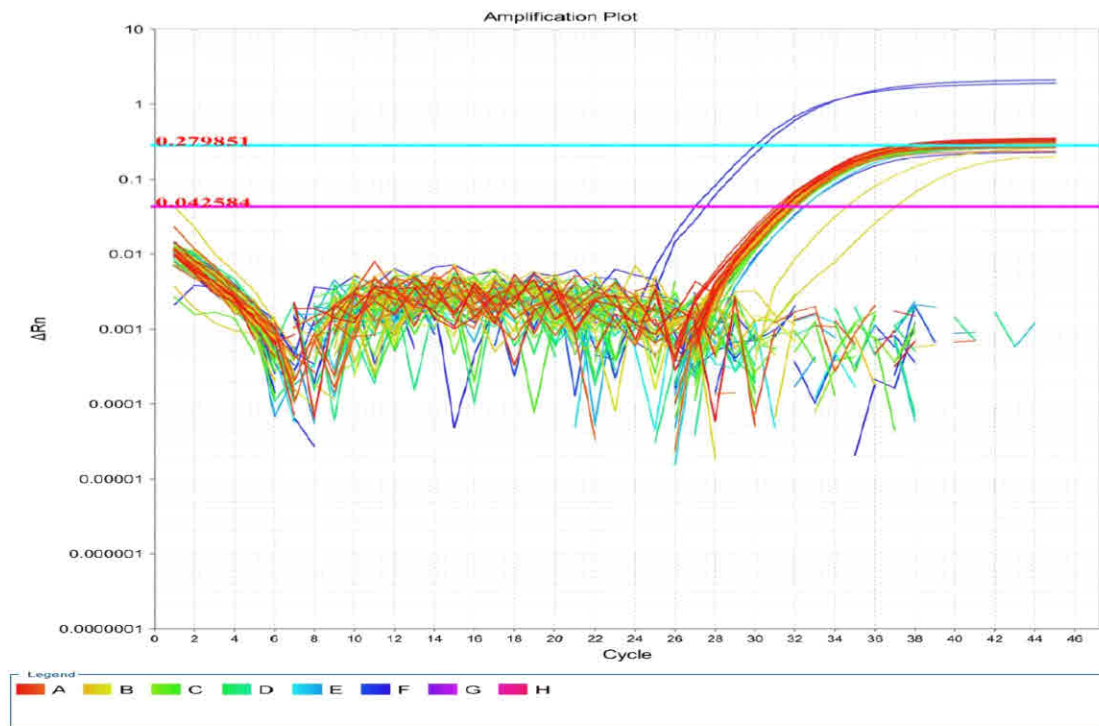


Figure N° 16 : Courbes linéaires d'amplification des échantillons, des contrôles positifs et négatifs (signal FAM et Cy5)





**Figure N° 17 : Courbes logarithmiques d'amplification des échantillons, des contrôles positifs et négatifs (signal FAM et Cy5)**

Les résultats (Figures N° 16 et 17) montrent une multiplication de Target 1 (Signal FAM) seulement pour les contrôles positifs (dilués et non dilués) ce qui signifie que l'ADN de *L. monocytogenes* de contrôle positif a été amplifié. Cependant les échantillons ne présentent aucune multiplication de Target 1 (Signal FAM), signifiant qu'aucun ADN de *L. monocytogenes* n'a été détecté dans l'échantillon. Les échantillons sont interprétés comme négatifs.

Par contre, il est observé une multiplication de Target 2 (Signal Cy5) pour tous les échantillons, ce qui signifie que le signal positif du contrôle positif interne exclut la possibilité d'une inhibition de la PCR (Figures N° 16 et 17).

L'axe de fluorescence est logarithmique et le bruit de fond (valeur seuil) a été préalablement soustrait des données par le logiciel, le Ct Threshold, le signal FAM est de 0,279851.

Le Ct Threshold pour le signal Cy5 est de 0,042584.

### III. DISCUSSION

#### III. 1. Quantification et contrôle de la pureté de l'ADN extrait obtenue par spectrophotométrie

Les quantités d'ADN extrait à partir des échantillons de lait étaient faibles ( $< 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) pour 59 des 65 échantillons testés. Ces faibles concentrations d'ADN s'expliqueraient probablement par les faibles charges bactériennes des prélèvements. Bien que 21 échantillons contiennent une quantité d'ADN très faible  $< 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , cette quantité reste cependant détectable par le Nanodrop qui présente un seuil de détection d'ADN de  $2 \text{ ng}/\mu\text{l}$  (Lemonnier, 2015).

La quantité d'ADN du premier échantillon positif pour la détection de *Brucella* spp. (Échantillon n°1) était de  $19,76 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , celle du deuxième échantillon positif (Échantillon n°13) était de  $27,51 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , notre étude présente donc un seuil de détection plus intéressant que le seuil détectable par le Nanodrop, ce qui permet de bénéficier d'un nombre élevé de copies de la séquence IS711 dans le génome, bien qu'une copie d'ADN de *Brucella* correspond à environ 5 fg (Queipo-Ortuño *et al.*, 2005),

Ces deux quantités d'ADN ( $19,76 \text{ ng}/\mu\text{l}$  et  $27,51 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) sont supérieures aux limites de détection plus faibles relevées dans des études précédentes ; l'une de 2 fg d'ADN de *B. abortus* dans l'étude de Bounaadja (2010) qui utilise la PCR en temps réel IS711, et l'autre de 7,5 fg d'ADN de *B. abortus* avec une PCR en temps réel mise au point par Newby *et al.*, (2003).

La pureté des extraits d'ADN jugée à travers les ratios de densité optique, est qualifiée de très bonne pour la contamination par les protéines, mais relativement mauvaise pour la contamination par les ARN. En matière de contamination par les sels chaotropiques (utilisés pour l'extraction), la pureté est qualifiée de très mauvaise. Ces résultats, sont similaires à ceux observés par d'autres auteurs tels que ceux de Pagneux, (2011) et Boudaoud, (2015).

### III. 2. Amplification du gène IS711 par PCR en temps réel (Détection de *Brucella* spp.)

*Brucella* a toujours été présente en Algérie et les principaux plans de lutte contre cette maladie reposaient principalement sur la détection de bovins infectés par des techniques sérologiques, suivie de l'abattage de ces animaux, depuis le lancement du programme de lutte contre cette maladie (1995). Cependant, pour réussir l'isolement, la concentration bactérienne doit être supérieure à 1000 UFC/g ou ml, mais l'infection peut être acquise avec 100 UFC (Martinez *et al.*, 2008a ; Martinez *et al.*, 2008b ; Szulowski *et al.*, 2013). En raison de la très faible dose infectieuse, *Brucella* est une infection facilement acquise au laboratoire, et des laboratoires de biosécurité de niveau 3 sont recommandés pour la culture de toutes les zoonoses à *Brucella* spp. qui infectent le bétail (Schwarz *et al.*, 2015). L'examen sérologique est important dans le diagnostic de routine de la maladie. Cependant, aucun des tests sérologiques n'a la capacité de différencier avec 100% les anticorps induits par une vaccination récente contre la brucellose et les anticorps induits par une infection naturelle (OIE, 2016 ; Godfroid *et al.*, 2010). Une autre lacune avec la sérologie est la difficulté de distinguer entre les réactions sérologiques dues à l'infection à *Brucella* et celles dues à des bactéries à réaction croisée comme *Yersinia enterocolitica* O : 9 (OIE, 2016 ; Godfroid *et al.*, 2010).

Des méthodes de détection d'ADN telles que la Réaction en Chaîne de Polymérase (PCR), (PCR nichée, PCR en temps réel, PCR multiplex) et la technique LAMP (test d'amplification isotherme par médiateur de boucle) sont maintenant utilisées pour la recherche et la confirmation de la détection de la brucellose chez les bovins (Soleimani *et al.*, 2013 ; Dhama *et al.*, 2014, Gupta *et al.*, 2014). La détection de *Brucella* au niveau de l'espèce à l'aide de tests PCR en temps réel est également possible à partir d'échantillons cliniques d'origine humaine et animale (Ali *et al.*, 2014).

Dans la présente étude, nous étudions la présence d'ADN de *Brucella* dans des échantillons de lait, nous avons choisi d'analyser tous les échantillons avec des amorces ciblant la séquence d'insertion *IS711*, car elle est spécifique et est une méthode très sensible pour la détection certaine du genre *Brucella* (Bounaadja *et al.*, 2009).

Cette étude a révélé que sur les 65 échantillons de lait de vaches séronégatives, 3,08% (n = 2) étaient positifs par qPCR pour l'ADN de *Brucella* avec des valeurs Ct comprises entre 37,97 et 40,48. Les résultats obtenus dans cette étude confirment que bien que l'excrétion bactérienne du lait était faible, elle reste cependant suffisante pour induire une infection. La consommation de produits laitiers non pasteurisés provenant d'animaux infectés par *Brucella* est la voie d'infection humaine la plus fréquente en général. Ainsi, l'utilisation de la pasteurisation du lait réduit la transmission de *Brucella* aux humains (Rubach *et al.*, 2013).

La prévalence de la contamination des laits crus par des *Brucella* spp. dans cette étude était inférieure à celles des études antérieures obtenues réalisées par Raies UI Islam *et al. al.*, (2013), Lindahl Rajala *et al.*, (2017) et Hinić *et al.*, (2009). Ces mêmes auteurs ont noté des taux de contamination similaires de cas positifs parmi leurs troupeaux examinés avec 11,23%, 11,8% et 11,1% respectivement.

Les différences enregistrées entre les résultats de la sérologie et ceux de la PCR observés dans la présente étude indiquent que le nombre réel de bovins infectés par *Brucella* dans la zone d'étude est sous-estimé par le dépistage sérologique. Des résultats sérologiques faussement négatifs ont été rapportés précédemment (Mailles *et al.*, 2012 ; Al Dahouk *et al.*, 2003 ; Godfroid *et al.*, 2002) et l'une des explications avancées serait la diminution des titres d'anticorps avec le temps (Godfroid *et al.*, 2010). Ainsi, les animaux testés séronégatifs dans la présente étude, mais qui ont été testés positifs par qPCR, auraient pu être exposés à *Brucella* et être devenus séronégatifs après entrée de la maladie dans la phase chronique. De même, si l'on échantillonne à un stade précoce de l'infection, c'est-à-dire dans les 14 premiers jours, la réponse immunitaire humorale n'a pas encore induit de niveaux détectables d'anticorps dans l'hôte (Gardner *et al.*, 2000). De plus, les individus infectés in utero ou au début de la période postnatale peuvent être infectés de manière latente et donc ne jamais devenir séropositifs (Corbel, 2006). On estime qu'environ 3,5% des vaches infectées donnent des descendants infectés latents (Saegerman *et al.*, 2010). En outre, MacMillan (1990) a rapporté que l'antigène RBT pourrait se détériorer lors des cycles répétés entre le réfrigérateur et la température ambiante pendant l'utilisation. Ces tests sérologiques ont leurs limites, surtout après que la maladie soit entrée dans la phase chronique, car l'aspect le plus important

de l'écologie de *Brucella* est leur capacité à établir une niche répliquative intracellulaire et à rester protégée des réponses immunitaires de l'hôte (Bargen *et al.*, 2012).

Cela pourrait expliquer en partie la différence entre la sérologie et les résultats de qPCR observés dans la présente étude. Hypothétiquement, la différence entre la sérologie et les résultats de qPCR pourrait être provoquée par une vaccination précédente contre la brucellose comme rapporté dans une étude en Egypte où les bovins vaccinés avec RB51 étaient testés négatifs par la sérologie mais positifs par qPCR (Gwida *et al.*, 2016). Mais ce n'est pas le cas dans la présente étude, où les échantillons de lait ont été prélevés sur des vaches laitières soumises au programme national de contrôle de 1995 selon lequel les bovins ne sont pas vaccinés contre la brucellose.

Dans cette étude, le seuil de positivité Ct correspond à 37,97 et 40,48. Ce résultat est en accord avec les résultats présentés par Bounaadja *et al.*, (2009) qui ont fixé le seuil de positivité Ct à 40 pour la PCR en temps réel IS711 qui correspond à une sensibilité de diagnostic de 72,6% et une spécificité de 99,4%.

### II. 3. Amplification du gène *hlyA* par PCR en temps réel (Détection de *L. monocytogenes*).

*L. monocytogenes* est un agent pathogène d'origine alimentaire responsable de la listériose chez l'homme, en raison de sa présence dans les aliments crus et prêts à consommer qui sont conservés à la température de réfrigération (Filioussis *et al.*, 2009; Pesavento *et al.*, 2010 ; Shi *et al.*, 2015). *L. monocytogenes* est la seule espèce du genre *Listeria* à être considérée comme pathogène chez l'homme (Snapir *et al.*, 2006). Elle a été impliquée dans l'infection d'origine des échantillons de l'environnement tels que le sol, l'eau, le fumier et la végétation (Strawn *et al.*, 2013).

Les principales voies de contamination des animaux (en particulier les animaux de rente) sont l'ensilage (Welchman *et al.*, 1997) et les animaux eux-mêmes. Les animaux porteurs excréant *L. monocytogenes* contribuent à la dispersion du pathogène dans le sol et la nourriture du bétail, créant ainsi un cycle continu de transmission féco-oral (Ho *et al.*, 2007).

Dans la grande majorité des cas humains, l'infection est le résultat de la consommation d'aliments contaminés (Fenlon *et al.*, 1996). Le lait constitue un des principaux vecteurs de transmission des *Listeria* ; plus particulièrement le lait cru de vaches en raison de sa large consommation. Un lait cru contaminé utilisé en fabrication fromagère, particulièrement ceux à pâte molle, à croûte fleurie ou à croûte lavée, favorise la multiplication de *Listeria* au cours de l'affinage. *L. monocytogenes* peut être isolée à partir des fromages à pâte molle ou semi molle, à pâte persillée, à pâte pressée ou à pâte fraîche (Copes *et al.*, 2000; Millet *et al.*, 2006).

La *listeria* est tuée, comme toutes les autres bactéries par la pasteurisation. Mais une contamination peut ensuite survenir à tout moment, par l'environnement ou par contact avec un autre aliment contaminé : il faut savoir que la *Listeria* se multiplie entre 4° et 45° et est capable de survivre aux températures de congélation (Kaismoune, 2009).

Les recherches menées sur la microbiologie du lait cru indiquent que la contamination par *L. monocytogenes* varie en général entre 0 et 45,3% depuis la collecte du lait jusqu'au consommateur (Prasad et Gupta, 1990). Cette fréquence est également liée au type de saison.



En Algérie, l'Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 Octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires, fixe les limites microbiologiques de *L. monocytogenes* des laits et des produits laitiers et notamment des laits crus et des sous-produits laitiers à base de lait cru à 100 UFC/ml (JORA, 2017).

La méthode traditionnelle de détection de cet agent pathogène d'origine alimentaire prend du temps; consistant en des étapes d'enrichissement, de repiquage sur des milieux sélectifs et d'incubation pendant une période de 48 à 72h. De nos jours, la méthode moléculaire par PCR a été donc la plus largement utilisée dans diverses études parce qu'il s'agit d'une procédure rapide avec une sensibilité et une spécificité pour la détection rapide et l'identification de bactéries pathogènes spécifiques de différentes sources (Sayed *et al.*, 2009; Dharmendra *et al.*, 2013 et Jamali *et al.*, 2013).

Plusieurs systèmes de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) pour la détection de *L. monocytogenes* ont été décrits, ciblant principalement les gènes de virulence tels que ceux codant pour *inLA* et *hlyA* (Dharmendra *et al.*, 2013). En 2006, Burtun et Blais ont étudié la fréquence du gène *HlyA* dans *L. monocytogenes* isolé des aliments, ainsi que les échantillons environnementaux et cliniques par la méthode PCR. La présence ou l'absence de certains gènes de virulence sont de bons indicateurs du niveau de virulence des souches de *Listeria* (liu *et al.*, 2007). Le gène *hlyA* est utilisé comme cible de la PCR car il est spécifique de l'espèce à identifier *L. monocytogenes* (Day et Basavanna, 2015).

Dans la présente étude, nous avons étudié la présence d'ADN de *L. monocytogenes* dans les échantillons de lait, pour ce faire, nous avons choisi d'analyser les échantillons avec des amorces ciblant le gène de virulence *hlyA*, codant pour le facteur de virulence, la lystériolysine O (LLO).

Cette étude a révélé des résultats négatifs pour la détection de *L. monocytogenes* dans tous les 65 échantillons de lait analysés, la prévalence de *L. monocytogenes* dans les 65 échantillons collectés dans cette étude était de 0%.



L'absence de *L. monocytogenes* dans nos échantillons de lait cru analysés est en accord avec les résultats réalisés par Al Kassaa *et al.*, (2016). Des études effectuées en Italie et en Suisse ont montré également des résultats négatifs (Ha *et al.*, 2002; Jemmi et Stephan, 2006).

Nos résultats sont inférieurs à ceux d'autres études réalisées dans d'autres pays comme la Turquie et la Corée, où la prévalence était de 6% pour le premier cité (Vardar-Ünlü *et al.*, 1998), et de 2% pour le second (Ha *et al.*, 2002; Jemmi & Stephan, 2006). En Europe, la prévalence de la listériose a augmenté de 19% entre 2008 et 2009 (EFSA, 2011). Cette augmentation était principalement survenue chez les personnes de plus de 65 ans (58%) (Goulet *et al.*, 2008). En 2009, 73 cas ont été rapportés en Suède (SVA, The National Veterinary Institute, 2011). En France, le taux d'incidence était estimé à cinq cas par million d'habitants en 2009 (Institut de veille sanitaire, 2009). En Espagne, la prévalence était 2,9% en 2001 (Soriano *et al.*, 2001). La prévalence de la listériose est de 6,5% aux Etats Unis (Van Kessel, 2004), 13 % au Brésil, 12 % au Canada (Jemmi & Stephan, 2006) et 2,2% en Iran (Moshtaghi et Mohamadpour, 2007).

Aux États-Unis, des enquêtes ont indiqué que *L. monocytogenes* était présente dans environ 4% des échantillons de lait cru examinés, ainsi que dans des laits non pasteurisés et des fromages préparés à partir de produits laitiers non pasteurisés (Washington *et al.*, 2006). En 2000, Waak *et al.*, ont étudié l'incidence des espèces de *Listeria* dans le lait entier cru provenant des cuves à lait de ferme et du lait cru de stockage d'une laiterie suédoise. *L. monocytogenes* et *L. innocua* ont été retrouvées dans 1,0% et 2,3 % des 294 échantillons de lait de réservoir de ferme (Waak *et al.*, 2002).

En Algérie, peu d'études ont été réalisées pour estimer la prévalence de *Listeria spp.* dans le lait cru de bovin :

- Bellouni (1990) a décrit 11 souches de *Listeria*, dont 2 *L. monocytogenes* à partir de 87 placentas de bovins, et 1 souche de *L. innocua* à partir de 16 fromages analysés.

- Lebres et Mouffok, (2000), ont décrit 10 souches de *Listeria* dont 7 *L. monocytogenes* à partir de 419 échantillons de denrées alimentaires autres que le lait.

- Lebres *et al.*, (2004) ont décrit 28 souches de *Listeria* dont 10 *L. monocytogenes* à partir de laits crus. Le même auteur a décrit un taux de 3,20% de *Listeria* dont un taux de 1,90% de *L. monocytogenes* à partir de laits crus (Lebres, 2006).
- L'étude réalisée par Hamdi *et al.*, (2007) a révélé une prévalence de 2,61 % de *L. monocytogenes* dans 153 échantillons de laits de ferme récoltés dans les régions d'Alger et Blida.
- Boubendir (2012), a noté que six échantillons de lait étaient contaminés par *Listeria spp.* sur 104 échantillons de laits crus analysés; soit un taux de contamination de 5,77 %.
- Dans une autre étude, réalisée sur des aliments autres que le lait cru de vaches, menée par Bouayad et Hamdi, (2012) sur des produits prêts à consommer, dans la région d'Alger, ils ont observé la présence de *Listeria spp.* dans 21 échantillons sur un total de 227. Parmi les 21 échantillons *Listeria*-positifs, ils notent 06 cas de *L. monocytogenes*, 11 de *L. innocua*, 03 de *L. ivanivii* et 01 de *L. welshimeri*.

D'autre part, des cas de la listériose humaine en Algérie ont été décrits par quelques auteurs:

- Le premier cas clinique de listériose humaine a été décrit par Benallègue *et al.*, (1967).
- Naïm (1987) a observé 1 cas humain à l'Hôpital Central de l'Armée d'Alger.
- Ramdani-Bouguessa et Rahal (2000), 2 cas de listériose néonatale.
- Naïm (Hôpital Central de l'Armée d'Alger - 2000) a observé 1 cas humain.

Même si *L. monocytogenes* cause relativement peu de cas de maladie humaine en Algérie et dans le monde, elle reste cependant un problème majeur de santé publique, car elle est très répandue et est présente chez de nombreux animaux, produits alimentaires, matières premières et environnement. La transmission classique de *L. monocytogenes* se fait via la consommation d'aliments contaminés par ce germe. Les aliments les plus à risques sont ceux à base de lait cru, la charcuterie, les légumes crus, ainsi que les plats préparés sans cuisson (Porto-Fett *et al.*, 2013). En comparaison avec d'autres pathogènes responsables d'infections d'origine alimentaire, la listériose a une incidence faible, mais conduit à une fréquence d'hospitalisation et un taux de mortalité élevés. Un dernier rapport du Centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) a estimé à 1 455 le nombre d'hospitalisations et 255 décès par an aux États-Unis (Scallan *et al.*, 2011). En effet, environ 25 à 30% des personnes atteintes de listériose décèdent, ce qui en fait une des plus fréquente cause de décès dû à une

contamination alimentaire. Pour cette catégorie de maladie, elle est la deuxième cause de mortalité juste après la salmonellose en France (Vaillant *et al.*, 2005).

L'absence de *L. monocytogenes* dans nos échantillons de lait cru analysés et dans ceux ayant des résultats similaires cités ci-dessus peut être due à des conditions défavorables pour sa colonisation et sa multiplication. Un ensilage bien acide conservé peut être un des facteurs qui explique l'absence de *L. monocytogenes* chez les bovins (Bemrah *et al.*, 1998). En effet, selon les analyses statistiques de Vilar *et al.*, (2007), la relation entre la mauvaise qualité de l'ensilage (due au pH élevé) et la présence de *L. monocytogenes* dans l'ensilage sont confirmées. Ils notent des taux d'isolement de 29,5 % contre 6,2 % pour un pH au-dessus ou en dessous de 4,5 respectivement. Ces observations sont aussi confirmées par de nombreux auteurs qui ont montré une augmentation du portage des *Listeria spp.* en hiver et au printemps (d'octobre à juin, suivant les pays), époques où les animaux, suivant les techniques d'élevage, sont nourris avec de l'ensilage le plus souvent. Le portage de *Listeria spp.* existe dans la plupart des troupeaux (vaches), avec un taux variant entre 0,5 à 10 % des animaux, suivant les saisons (AFSSA, 2000).

Jaradat *et al.*, affirment, dans leur travail, que la majorité des cas de contamination animale par *L. monocytogenes* apparait dans les régions géographiques froides telles que les pays Nord-Américains et les pays Nord-Européens (Jaradat *et al.*, 2002). Ce phénomène peut être expliqué par l'accroissement des risques de contamination pendant la stabulation des animaux (Nightingale *et al.*, 2005). L'utilisation des ensilages durant l'hiver pourrait également expliquer l'augmentation des cas de contamination sur cette période.

L'absence de *L. monocytogenes* dans nos échantillons peut être due à la période de prélèvement des échantillons, prélevés durant l'été d'une façon aseptique évitant ainsi la contamination du lait par des *listeria* de l'environnement, à la présence de bactériocines secrétées par des bactéries lactiques appartenant à la flore intestinale des bovins, ou bien à la bonne santé des bovins sélectionnés.

Plusieurs recherches conduites ont confirmé l'effet inhibiteur des bactériocines produites par les souches d'*Enterococcus* contre la croissance et le développement des *Listeria* (Elotmani *et al.*, 2002 ; Laukova et Marekova, 2002 ; Achemchem *et al.*, 2004).

La listériose de l'homme est présente dans les pays industrialisés mais il semble qu'elle est quasiment absente des pays en développement. Outre les différences existant dans les moyens de diagnostic et de surveillance sanitaire, cette répartition géographique s'expliquerait par une meilleure hygiène et par la généralisation de la chaîne du froid dans les pays développés. En effet, de manière paradoxale, il semble que ce soit la bonne hygiène des procédés de fabrication et le développement de la chaîne du froid qui soient à l'origine d'une augmentation des cas de listériose observée depuis une quarantaine d'années (FAO/OMS, 2002).

L'augmentation de l'incidence des listérioses humaines dans les pays Nord-Américains et Nord-Européens pourrait s'expliquer par le vieillissement de la population, l'augmentation du nombre de personnes immunodéprimées (cancéreux, malades greffés...), l'évolution des habitudes alimentaires privilégiant les plats préparés, la consommation importante d'aliments à risques (fromage au lait cru, charcuterie) et l'augmentation des dates limites de consommation (Desneux, 2015).

## CONCLUSION

En plus de satisfaire les besoins de la population par le biais de l'importation de lait en poudre, l'Algérie doit assurer la fourniture d'un lait cru de bonne qualité hygiénique pour préserver la santé du consommateur.

A l'état sain, la sécrétion lactée produite dans la mamelle est stérile. La présence de germes dans le lait est généralement un signe d'une infection de la glande.

Les mammites constituent une entrave à l'essor de la production laitière. Elles revêtent une importance hygiénique et surtout économique certaine. Elles entraînent aussi bien des altérations quantitatives que qualitatives du lait. De même, la présence des germes pathogènes constitue une véritable menace pour la santé publique. Les coûts du traitement, la chute de production et les réformes anticipées des vaches entraînent de lourdes pertes économiques pour le producteur.

L'objectif de cette étude est de détecter la présence des *Brucella* spp. chez des vaches laitières testées auparavant séronégatives et de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru dans la région de Batna.

Les résultats obtenus ont révélé la présence des *Brucella* spp. dans 2 des 65 échantillons analysés soit une prévalence des *Brucella* spp. de 3,08%.

Notre étude a confirmé que la technique de PCR en temps réel IS711 est un outil intéressant pour la détection de *Brucella* dans le lait cru, car elle permet d'éviter les faux positifs liés aux souches apparentées génétiquement. Cette technique permet également la détection de toutes les espèces et biovars de *Brucella* testées.

Disposer d'une telle technique de PCR en temps réel suffisamment sensible pouvant être utilisée comme outil de diagnostic de la brucellose dans les conditions du terrain est une avancée technologique décisive puisque la sérologie basée principalement sur l'antigène LPS présente un défaut principal de spécificité, majoritairement avec *Yersinia enterocolitica* O : 9 ; et que la bactériologie, bien que nécessaire pour l'isolement de la souche impliquée dans l'infection demeure une méthode longue et lourde.

Notre travail a également montré l'absence de *L. monocytogenes* dans les échantillons de lait cru analysés, la prévalence de *L. monocytogenes* dans les 65 échantillons analysés dans

cette étude est de 0%. La méthode utilisée est la détection du *gène hlyA* spécifique d'espèce, par la technique PCR en temps réel, qui est une méthode rapide, sensible et spécifique.

L'absence de *L. monocytogenes* dans les échantillons pourrait être liée à la bonne santé des bovins sélectionnés, ou bien au fait que les prélèvements aient été réalisés de façon aseptique, ce qui a permis d'éviter la contamination du lait par des listeria de l'environnement. En fait, on considère que *L. monocytogenes* est très répandue dans les pays industrialisés, et rare en Afrique du nord et en Algérie, ceci serait dû à un manque de moyens de diagnostic et de système de surveillance de cette bactérie.

L'augmentation de la présence de *L. monocytogenes* dans les aliments et l'augmentation des sujets à risque posent un vrai problème de santé publique. Une surveillance régulière des produits alimentaires susceptibles d'être à l'origine d'une contamination, semble être nécessaire pour assurer la qualité et la salubrité des aliments.

La listériose est un problème majeur de santé publique, elle a des retombées négatives sur plusieurs secteurs sociaux et économiques.

En conclusion, la prévention de la brucellose et de la listériose doivent faire l'objet d'un effort communautaire associant les responsables de la médecine vétérinaire et de la santé publique. L'utilisation systématique de techniques moléculaires telles que la technique de PCR en temps réel permettrait de dépister tous les animaux pouvant être à l'origine d'une contamination humaine et leur élimination des circuits de consommation.

## Références

- 1- Abubakar M., Mansoor M., Arshed M.J. (2012). Bovine brucellosis: old and new concepts with Pakistan perspective. *Pak. Vet. J.*, **32** : 147-155.
- 2- Acha P. N, Szyfres B. (2005). Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, 2<sup>ème</sup> éd. Paris, France, OIE: 1083p.
- 3- Achemchem F., Abrini J., Martinez-Bueno M., Valida E., Maqueda M. (2004). Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. *Congrès International de Biochimie*, Marrakech. 3-6 Mai 2004. p. 384-388.
- 4- Adamou Harouna H. (2014). Évaluation de trois tests de dépistage de la brucellose bovine pour une aide décisionnelle de contrôle de la maladie dans le bassin laitier de niamey (niger). Mémoire de master en sante publique vétérinaire. École inter-etats des sciences et médecine vétérinaires de dakar, pp 44.
- 5- Adugna K., Agga G., Zewde G. (2013). Seroepidemiological survey of bovine brucellosis in cattle under a traditional production system in western Ethiopia. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **32** : 765-773.
- 6- AFSSA. (2000). (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). Rapport de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*, 146 p.  
<https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-Listeria2000.pdf>. Consulté le 18/03/2018.
- 7- Aggad H., Boukraa L. (2006). Prevalence of bovine and human brucellosis in western Algeria: comparison of screening tests. *East. Mediterr. Health J.*, **12** : 119-128.
- 8- Ahmed M., Elmeshri S., Abuzweda A., Blauo M., Abouzeed Y., Ibrahim A., Salem H., Alzwam F., Abid S., Elfahem A., Elrais A. (2010). Seroprevalence of brucellosis in animals and human populations in the western mountains region in Libya, December 2006-January 2008. *Euro Surveill.*, **15(30)**. pii: 19625.



- 9- AIM. (1993). Arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. p. 16 (N° JORA : 069 du 27-10-1993).
- 10- Akbarmehr J., Ghiyamirad M. (2011). Serological survey of brucellosis in livestock animals in Sarab City (East Azarbayjan province), Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **5** : 1220-1223.
- 11- Al Dahouk S., Tomaso H. Nöckler K., Neubauer H., Frangoulidis D. (2003). Laboratory based diagnosis of brucellosis – a review of the literature. Part II : serological tests for brucellosis. *Clin. Lab.*, **49(11-12)** : 577-589.
- 12- Al Dahouk S., Nöckler K., Scholz H. C., Pfeffer M., Neubauer H., Tomaso H. (2007). Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **45(11)** : 1464-1470.
- 13- Al Kassaa I., El Omari Kh., Saati M., Ismail B., Hamze M. (2016). Prévalence de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru de vache au Liban Nord. *Leb. Sci.J.*, **17(1)** : 37-43.
- 14- Al-Majali A. M., Talafha A. Q., Ababneh M. M., Ababneh M. M. (2009). Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Jordan. *J. Vet. Sci.*, **10** : 61-65.
- 15- Alais C., Linden G. (2004). Biochimie alimentaire. 5<sup>ème</sup> Ed : Lavoisier Paris, 250p (162-164).
- 16- Ali S., Ali Q., Melzer F., Khan I., Akhter S., Neubauer H., Jamal, S. M. (2014). Isolation and identification of bovine *Brucella* isolates from Pakistan by biochemical tests and PCR. *Trop. Anim. Health Prod.*, **46** : 73-78.
- 17- Allain V. (2011). Etude descriptive de l'identification des bactéries du lait dans un élevage à l'aide de la bactériologie, des comptages cellulaires de tank (CCT) et des comptages cellulaires individuels (CCI). Thèse de Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'ALFORT, France, pp 122.
- 18- Amellal R., (1995). La filière lait en Algérie : Entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. In : Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000. *Opt. Méd., Série B, Etudes et Recherches*, **14** : 229-238.

- 19-** Anonyme. (1999). Avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (approuvé le 29 juin 1999), Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire N°4, 2000.
- 20-** ANSES. (2012). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la survie de *Brucella* dans les produits laitiers, 16p.
- 21-** ANSES. (2013). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux « mesures à prendre sur les bouquetins pour lutter contre la brucellose sur le massif du Bargy, Haute-Savoie », 46p.
- 22-** Argente G., Lardoux S., Le Berre K., Labbe J-F. (2005). Valeur de l'observation clinique de symptômes simples de mammite pour prédire les bactéries en cause. *Bull. G. T. V.*, **32** : 39-46.
- 23-** Arraba A., Benjelloun., Hamama A., Hamimaz R., Zahar M., (2001). Organisation de la filière laitière au Maroc. In : Padilla M., Ben Saïd T., Hassainya J., Le Grusse P. "Les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée : état des lieux, problématique et méthodologie pour la recherche". Ciheam Montpellier, *Opt. Méd.*, Série B **32** : 47-62.
- 24-** Audurier A., Martin C. (1989). Phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food. Microbiol.*, **8** : 251-257.
- 25-** Aulakh H. K., Patil P. K., Sharma S., Kumar H., Mahajan V., Sandhu K. S. (2008). A Study on the Epidemiology of Bovine Brucellosis in Punjab (India) Using Milk-ELISA. *Acta Vet. Brno*, **77** : 393-399.
- 26-** Baddour M. M., Alkhalifa D. H. (2008). Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can. J. Microbiol.*, **54** : 352-357.
- 27-** Badinand F. (1994). Maîtrise du taux cellulaire du lait. *Rec.Méd.Vét.*, **170** : 419-427.
- 28-** Banai M., Corbel M. (2010). Taxonomy of *Brucella*. *Op. Vet. Sci. J.*, **4** : 85-101.
- 29-** Bang B. (1897). The etiology of epizootic abortion. *J. Comp. Pathol. Ther.*, **10** : 125-149.

- 30-** Bargaen K., Gorvel J.P., Salcedo S.P. (2012). Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol. Rev.*, **36** : 533-562.
- 31-** Bastien J. (1994). Suivi de la qualité du lait et de sa transformation à la ferme exemple de démarche coordonnée appliquant les vétérinaires praticiens. *Rec.Méd.Vét.*, **170(6-7)** : 486-492.
- 32-** Bellouni R. 1990. *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en médecine (DESM), INESSM – Alger, pp. 165.
- 33-** Bemrah N., Sanaa M., Cassin M. H., Griffiths M. W., Cerf O. (1998). Quantitative risk assessment of human *Listeriosis* from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prev. Vet. Med.*, **37**: 129-145.
- 34-** Ben Hassen S., Messadi L., Ben Hassen A. (2003). Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. *Ann.Méd.Vét.*, **147** : 41-47.
- 35-** Benallègue A., Benhassine M., Hadji A., Grangaud J. P., Mazouni M. (1968). Méningite à *Listeria monocytogenes*. *Alg. Méd.*, **5(1)** : 29-32.
- 36-** Berry E. A., Hillerton J. E. (2002). The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *J. dairy Sci.*, **85** : 112-121.
- 37-** Berthelot X., Fabre J. M., Houffschmitt P., Lepreux B., Morvan H. (1997). Estimation de la fréquence des germes responsables de mammites chez la vache laitière en France. *Rech. Ruminants.*, **4** : 283-284.
- 38-** Bhutto A. L., Murray R. D., Woldehiwet Z. (2012). California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, **92** : 13–17.
- 39-** Bielecki J., Youngman P., Connelly P. (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature*, **345** : 175-176.

- 40- Blétry O., Girszyn N., Gepner P., Kahn J-E., Leport J., Mathieu E., Melchior Y. (2009). Du symptôme à la prescription en médecine générale : symptômes, diagnostic, thérapeutique. Ed. Paris, 924p.
- 41- Bogdanovich T, Skurnik M, Lübeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. (2004). Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J. Clin. Microbiol.*, **42** : 2261-2263.
- 42- Borba M., Stevenson M., Goncalves V., Neto J., Ferreira F., Amaku M., Telles E., Santana S., Ferreira J., Lobo J., Figueiredo V. C. F., Dias R. A. (2013). Prevalence and riskmapping of bovine brucellosis in Maranhao State, Brazil. *Prev. Vet. Med.*, **110** : 169-176.
- 43- Boscher E., Houard E., Denis M. (2012). Prevalence and Distribution of *Listeria monocytogenes* Serotypes and Pulsotypes in Sows and Fattening Pigs in Farrow-to-Finish Farms (France, 2008). *J. Food Prot.*, **75** : 889-895.
- 44- Boualem B. H., Belkadi S. A., Benadbella A. (2009). Thème zoonose : La prise en charge de la brucellose rurale, Elsevier Masson France, Médecine des maladies infectieuses, 39- S68.
- 45- Bouayad L., Hamdi T-M. (2012). Prevalence of *Listeria spp.* in ready to eat foods (RTE) from Algiers (Algeria), *Food Control*, 23 (2012) : 397-399
- 46- Bouaziz O. (2005). Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Mentouri-Constantine. pp 235.
- 47- Boubendir A. (2012). Analyse et prévalence du risque infectieux de *Listeria monocytogenes* dans les laits crus récoltés dans deux régions à climat différent (zone semi-aride et le Nord-Est algérien) : Modélisation spatiale de la diversité floristique. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Mentouri-Constantine. pp 160.
- 48- Bouchot M. C., Catel J., Chirol L., Ganiere J. P., Le Menec M. (1985). Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. *Re. Méd.Vét.*, **161(6-7)** : 567-577.
- 49- Boudaoud A. (2015) Caractérisation moléculaire des virus sauvages de la maladie de Gumboro. Thèse de Doctorat en Sciences vétérinaires. Université de Batna1. pp 162.

- 50-** Boukary A. R., Saegerman C., Abatih E., Fretin D., Bada R., De Deken R., Harouna H. A., Yenikoye A., Thys E. (2013). Seroprevalence and potential risk factors for *Brucella* spp. Infection in traditional cattle, sheep and goats reared in urban, periurban and rural areas of Niger. *PloS One*, **8** : e83175.
- 51-** Boumghar M. Y., (2000). La filière lait en Algérie : une production largement insuffisante. *Agroligne*, **3** : 8-9.
- 52-** Bounaadja L., Albert D., Chénais B., Hénault S., Zygmunt M. S., Poliak S., Garin-Bastuji, B. (2009) Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of *IS711*, *bcs31* and *per* target genes. *Vet. microbiol.*, **137** : 156-164.
- 53-** Bounaadja L. (2010). Développement d'une PCR en temps réel pour la détection des *Brucella* et relation avec le genre *Ochrobactrum*. Thèse de doctorat. Spécialité : Biologie Des Organismes. Université de Maine. pp 200.
- 54-** Bourbouze A., (2001). Le développement des filières lait au Maghreb ; Algérie, Maroc, Tunisie : trois images, trois stratégies différentes. *Agroligne*, **14** : 9-19.
- 55-** Bradley A. J. (2002). Bovine mastitis : an evolving disease. *Vet. J.*, **164 (2)** : 116-128.
- 56-** Bréand S., Fardel G., Flandrois J. P., Rosso L., Tomassone R. (1998). Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. *Int. J. Food. Microbiol.*, **40** : 185-195.
- 57-** Brock T., Madigan M., Martinko J. (2007). Biologie des micro-organismes. 11<sup>ème</sup> édition Éd. Pearson, Paris. France. ISBN 978-2-7440-7209-3. 1047p.
- 58-** Brouillet P., Raguét Y. (1990). Logement et environnement des vaches laitières et qualité du lait. *Bull. G. T. V.*, 4B-357 : 13-22.
- 59-** Bula M., Ndumbi M. W., Banza M. (1987). Dépistage de la brucellose bovine dans le Sud-Est du Zaïre par l'épreuve de fixation du complément. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **6 (4)**: 1037-1042.

- 60-** Burtun W., Blais M. (2006). Identification of presumptive positive *Listeria monocytogenes* from foods and environmental samples by the polymerase chain reaction (PCR). Health Canada, *Food & Nutrition*, **3**: 22-27.
- 61-** Bustin S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrin.*, **25** : 169-193.
- 62-** Calvet F., Heaulme M., Michel R., Demoncheaux J. P., Boue S., Girardet C. (2010). Brucellose et contexte opérationnel. *Med. Arm.*, **38 (5)** : 429-434.
- 63-** Camilli A., Tinley L., Portnoy D. (1993). Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, **8** : 143-157.
- 64-** Capasso L. (2002). Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J. Infect.* **45** : 122–127.
- 65-** Carlier V. (2000). *Listeria monocytogenes* et filière porcine. *In* : Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine : L'assurance qualité en filière porcine : risque ou opportunité, Maisons-Alfort, France, 7-8 décembre 2000, 129-141 p.
- 66-** Carus W. S. (2001). *Bioterrorism and biocrimes, The illicit Use of Biological Agents Since 1900*. National Defense University, Washington D.C. 219 p.
- 67-** Carvalho-Nota A., Mol J., Xavier M., Paixao T., Lage A., Santos R. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.*, **184(2)** : 146-155.
- 68-** Catteau M. (2006). *Listeria monocytogenes*. AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). In Modeste Tabi G. (2014). *Listeria monocytogenes* et femmes enceintes. Thèse de Docteur en Pharmacie. Université de Lorraine. pp 88.
- 69-** Chakroun M., Bouzouaia N. (2007). La brucellose : une zoonose toujours d'actualité. *Rev. Tun. Infectiol.*, **1(2)** : 1-10.
- 70-** Charline M. N., Brecht D., Frederick J. A., Geert V., Haagsma J., Kirk M., Havelaar A., Speybroeck N. (2014). The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, **14(11)** : 1073–1082.

- 71- Charpentier E., Courvalin P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Ant. Agents. Chemotherapy*, **43**: 2103-2108.
- 72- Chiara M., Caruso M., D'Erchia A. M., Manzari C., Fracalvieri R., Goffredo E., Latorre L., Miccolupo A., Padalino I., Santagada G., Chiocco D., Pesole G., Horner D. S., Parisi A. (2015). Comparative Genomics of *Listeria* Sensu Lato: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Gen. Biol. Evol.*, **7** : 2154-2172.
- 73- Chico-Calero I., Suarez M., Gonzalez-Zorn B., Scotti M., Slaghuis J., Goebel W., Vazquez-Boland J. A., European *Listeria* Genome C. (2002). Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA.*, **99** : 431-436.
- 74- Chimana H. M., Muma J. B., Samui K. L., Hangombe B. M., Munyeme M., Matope G., Phiri A. M., Godfroid J., Skjerve E., Tryland M. (2010). A comparative study of the seroprevalence of brucellosis in commercial and small-scale mixed dairy-beef cattle enterprises of Lusaka province and Chibombo district, Zambia. *Trop. Anim. Health. Prod.*, **42** : 1541-1545.
- 75- Cloeckert A., Grayon M., Grepinet O. (2000). An *IS711* element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7(5)** : 835-839.
- 76- Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Cantoni C., Comi G. (2002). Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **68** : 6273-6282.
- 77- Copes J., Pellicer K., Echeverria H. G., Stanchi N. N. O., Martinez C., Leeardi. (2000). Investigation of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses, *Rev. Arg. Microbio*, **32** : 175-178.
- 78- Corbel M. J. (2006) *Brucellosis in humans and animals*, World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health. Available:  
[www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf). Consulté 12 October 2016.



- 79- Cossart P., Kocks C. (1994). The actin-based mobility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, **13** : 395-402.
- 80- Cossart P., Toledo-Arana A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microb. Inf.*, **10** : 1041-1050.
- 81- Coullioud P., Martel J. L., Brouillet P., Fedayin M. (1991). Identification et sensibilité aux antibiotiques des diverses espèces de staphylocoques associées à des mammites bovines inapparentes et subcliniques. *Re. Méd.Vét.*, **142** : 39-47.
- 82- Coulon J. B., Dauver F., Gare J. P. (1996). Facteurs de variations de la numération cellulaire du lait chez les vaches laitières indemnes de mammites cliniques. INRA. *Prod. Anim.*, **9(2)** : 133-139.
- 83- Coulon J. B., Lescourret F. (1997). Effet des mammites cliniques sur la production chez la vache laitière. *Renc.Rech. Ruminants.*, **4** : 265-268.
- 84- Coulon J. B. (1999). Facteurs Physiologiques de variations des concentrations cellulaires du lait. *Journées nationales G. T. V.* INRA., Nantes / 26-27-28 mai, 1999, 131-13. In : Gabli A. (2005). Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammites et de vaches saines. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences Vétérinaires. Option : Bactério- Immunologie. Université Mentouri-Constantine. pp 82.
- 85- Courtet Leymarios F. (2010). Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse pour le doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil, pp 18-37.
- 86- Cox N. A., Bailey J. S., Berrang M. E. (1997). The presence of *Listeria monocytogenes* in the integrated poultry industry. *J. Appl. Poult. Res.*, **6** : 116-119.
- 87- Cummins A. J., Fielding A. K., McLauchlin J. (1994). *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J. Infect.*, **28** : 89-91.
- 88- Cure M., Bouteille B., Brisabois A. (2004). *Le risque biologique*. Édition : Masson, Issy-les-Moulineaux. 238 p.

- 89-** D'anastasio R., Staniscia T., Milia M. L., Manzoli L., Capasso L. (2011). Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol. Inf.*, **139** : 149-156.
- 90-** Dao S., Traore M., Sangho A., Dantoume K., Oumar A. A., Maiga M., Bougoudogo F. (2009). Séroprévalence de la brucellose humaine à Mopti, Mali. *Rev. Tun. Infectiol.*, **2** : 24-26.
- 91-** Day J. B., Basavanna U. (2015). Real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in infant formula and lettuce following macrophage-based isolation and enrichment. *J. Appl. Microbiol.*, **118(1)** : 233-244.
- 92-** De Chastellier C., Berche P. (1994). Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages : evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect. Immun.*, **62** : 543-553.
- 93-** De Figueiredo P., Ficht T., Rice-Ficht A., Rossetti C., Adams L. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis Review of *Brucella*-Host Interactions. *Am. J. Pathol.*, **185** (6) : 1505-1517.
- 94-** De Jong M. F., Tsolis R. M. (2012). Brucellosis and type IV secretion. *Future Microbiol.*, **7** : 47-58.
- 95-** De La Sota M., Bagnat E., Cosentino B., Nicola A. (2005). Aproximacion a la determinacion de la prevalencia nacional de la brucelosis bovina. *Rev. Col. Vet. Prov. Bs. As.*, **11** : 31-35.
- 96-** De Massis F., Di Girolamo A., Petrini A., Pizzigallo E., Giovannini A. (2005). Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997- 2002. *Clin. Microbiol. Inf.*, **11** : 632-636.
- 97-** Dean A. S., Bonfoh B., Kulo A. E., Boukaya G. A., Amidou M., Hattendorf J., Pilo P., Schelling E. (2013). Epidemiology of brucellosis and Q fever in linked human and animal populations in northern togo. *PloS One*, **8** : e71501.
- 98-** Debry G. (2006). Lait, nutrition et santé. Ed : tec et doc Lavoisier Paris. 566 p.

- 99-** Debuyser M. L., Lapeyre C. (1994). Mammites à Staphylocoques et sécurité alimentaires. *Le Point Vétérinaire*, **26** (Numéro spécial. Ruminant et Santé Publique) : 79-82. ISSN 0335-4997.
- 100-** den Bakker H. C., Cummings C. A., Ferreira V., Vatta P., Orsi R. H., Degoricija L., Barker M., Petrauskene O., Furtado M. R., Wiedmann M. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *Bmc Genomics*, **11** : 688. Doi: 10.1186/1471-2164-11-688.
- 101-** den Bakker H. C., Desjardins C. A., Griggs A. D., Peters J. E., Zeng Q., Young S. K., Kodira C. D., Yandava C., Hepburn T. A., Haas B. J., Birren B. W., Wiedmann M. (2013). Evolutionary Dynamics of the Accessory Genome of *Listeria monocytogenes*. *PLoS One*, **8** : e67511.
- 102-** den Bakker H. C., Warchocki S., Wright E. M., Allred A. F., Ahlstrom C., Manuel C. S., Stasiewicz M. J., Burrell A., Roof S., Strawn L. K., Fortes E., Nightingale K. K., Kephart D., Wiedmann M. (2014) *Listeria floridensis* sp nov., *Listeria aquatica* sp nov., *Listeria cornellensis* sp nov., *Listeria riparia* sp nov and *Listeria grandensis* sp nov., from agricultural and natural environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64** : 1882-1889.
- 103-** Deng X., Phillippy A. M., Li Z., Salzberg S. L., Zhang W. (2010). Probing the pan-genome of *Listeria monocytogenes*: new insights into intraspecific niche expansion and genomic diversification. *Bmc Genomics*, **11** : 500. Doi: 10.1186/1471-2164-11-500.
- 104-** Desneux J. (2015). Etude de la survie et de la viabilité de *Listeria monocytogenes* dans les effluents d'élevages porcins. Thèse de docteur. Université de Rennes 1. Option: chimie. pp239.
- 105-** Dhama K., Karthik K., Chakraborty S., Tiwari R., Kapoor S., Kumar A., Thomas P. (2014) Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): A new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: A review. *Pak. J. Biol. Sci.*, **17** : 151-166.
- 106-** Dharmendra K., Soni A., Rakesh K., Singh B., Durg V., Singh B., Suresh K. (2013): Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Ganges water, human clinical and milk samples at Varanasi. *Ind. Infect, Gen. Evol.* **14**: 83–91.

- 107-** Dictionnaire Médical (2009). 6<sup>ème</sup> édition. Ed. *Elsevier Masson S.A.S.* 62, rue Camille Desmoulins - 92442 Issy-les-Moulineaux cedex. Openmirrors.com. 527 p.
- 108-** Dilmi B. (2008). Recommandation pour une stratégie générale du secteur laitier en Algérie : Séminaire international sur la filière lait : production et biotechnologie, Chlef 02, 03 Décembre, 2008.
- 109-** Dmowska K., Wieczorek K., Lynch O., Osek J. (2013). Typing of *Listeria monocytogenes* isolated from slaughtered cattle and beef meat. *Bull. Vet. Inst. Pul.*, **57** : 179-183.
- 110-** Domann E., Wehland J., Rohde M. (1992). Novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the prolinerich region of vinculin. *Embo J.*, **11(5)** : 1981-1990.
- 111-** Don Warbuton *et al.* (2012). In Desneux J. (2015). Etude de la survie et de la viabilité de *Listeria monocytogenes* dans les effluents d'élevages porcins. Thèse de docteur. Université de Rennes 1. pp 239.
- 112-** Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. (2004a). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **42** : 3819-3822.
- 113-** Doumith M., Cazalet C., Simoes N., Frangeul L., Jacquet C., Kunst F., Martin P., Cossart P., Glaser P., Buchrieser C. (2004b). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.*, **72** : 1072-1083.
- 114-** DSV (2007). Direction des Services Vétérinaires. Bulletin sanitaire vétérinaire. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Alger.
- 115-** DSV (2010). (Direction des Services Vétérinaires). Bulletin sanitaire vétérinaire.

- 116-** Durel L., Faroult B., Lepoutre D., Brouillet P., Le Page P. (2004). Mammites des bovins (cliniques et subcliniques). Démarches diagnostiques et thérapeutiques. *La Dépêche Technique*. Supplément technique 87 à la Dépêche Vétérinaire du 20 décembre 2003 au 2 janvier 2004. 39 p.
- 117-** EFSA (2011). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2009. *EFSA Journal*, **9(3)**: 2090. (www.efsa.europa.eu).
- 118-** El Mouhtadi S. (2014). Actualités épidémiologiques et prophylaxiques de la listériose. Thèse de Doctorat en Médecine. Université Mohammed V, Rabat. pp 105.
- 119-** Elmnasser N., Ritz-Bricaud M., Guillou S., Leroi F., Orange N., Bakhrouf A., Federighi M. (2006). Réponse adaptative de *Listeria monocytogenes* au stress osmotique et froid: Implication en sécurité des aliments. *Re. Méd.Vét.*, **157(2)** : 92-101.
- 120-** Elotmani F., Revol-Junelles A. M., Assobhei O., Milliere J. B. (2002). Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* Strains isolated from Raïb, a Moroccan Traditional Fermented Milk. *Curr. Microbiol.*, **44** : 10-17.
- 121-** Evans A.C. (1918). Further studies on bacterium abortus and related bacteria: a comparison of bacterium abortus with bacterium bronchisepticus and with the organism that causes Malta fever. *J. Infect. Dis.*, **22** : 580-593.
- 122-** Ewalt D. R, Payeur J. B, Martin B. M, Cummins D. R, Miller W. G. (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6(4)** : 448-452.
- 123-** Fabre J. M., Morvan H., Lebreux B., Houffschmitt P., Berthelot X. (1997a). Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France, partie 1 : mammites cliniques. *Bull. G. T. V.*, **3-B** : 17-23.
- 124-** Fabre J. M., Morvan H., Lebreux B., Hanffschmitt P., Berthelot X. (1997b). Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France. Article2. Mammite subclinique. *Bull. G. T. V.*, **5B-573** : 9-15.

- 125-** Fabre J. M., Bertholot X., Bousquet E., Bosquet G., Laumonnier G., Seegers H. (1999). Traitement des mammites subcliniques en lactation : expérimentation d'un nouveau protocole dit << traitement en parallèle >>. *G. T. V.* n°1, Mai 1999, 49-58.
- 126-** FAO/OMS. (2002). Forum Mondial des responsables de la sécurité sanitaire des aliments. Marrakech. Maroc, 28 au 30 Janvier. pp 1-223.
- 127-** Farber J. M. (1991). *Listeria monocytogenes*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74** : 701-704.
- 128-** Farber J. M., Paterkin P. (1991). *Listeria monocytogenes*. A food- borne pathogen. *Mirobiol. Rev.*, **55** : 476-511.
- 129-** Faroult B. (1994). Méthodologie d'approche des infections mammaires en troupeau laitier et maîtrise de la qualité hygiénique du lait. *Rec.Méd.Vét.*, **170(6-7)** : 469-478.
- 130-** Faroult B. (1998). Stratégie de traitement des mammites cliniques. *Bull. G. T. V.*, 5B-**599** : 27-33.
- 131-** Faroult B. (2000). Les mammites subcliniques et les mammites cliniques aiguës. *Maladies des bovins 3<sup>ème</sup> éditions*. France Agricole, 64-75.
- 132-** Fekete A., Bantle J. A., Halling S. M. Sanborn M. R. (1990). Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* **69(2)** : 216-227.
- 133-** Fenlon, D.R., Wilson, J. and Donachie, W. (1996) The Incidence and Level of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food Sources at Primary Production and Initial Processing. *J. Appl. Microbiol.*, **81**: 641-650.
- 134-** Fensterbank R. (1977). Diagnostic allergique de la brucellose bovine, utilisation du test allergique dans les troupeaux infectés. *Ann. Rech. Vét.*, **8(2)** : 195-201.
- 135-** Ferrah A., (2000). L'élevage bovin laitier en Algérie : problématique, question et hypothèses pour la recherche 3<sup>ème</sup> JRPA « Conduite et performances d'élevage » Tizi-Ouzou : 40-47.

- 136-** Filioussis G., Anders J., Joachim F., Vincent P. (2009). Food control short communication: prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. *Food Control*, **21** : 708-713.
- 137-** Flenders K. J., Donnelly C. W. (1994). Injury, resuscitation and detection of *Listeria* spp. from frozen environments. *Food. Microbiol.*, **11** : 473-480.
- 138-** Flinois J., David C. (1977). Mammites bovines - quelques données. *Bull. Soc. Vét. Prat. Fr.*, **61** : 571-584.
- 139-** Foster G., Macmillan A. P., Godfroid J., Howie F., Ross H. M., Cloeckaert A., Reid R. J., Brew S., Patterson I. A. (2002). A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.*, **90(1-4)** : 563-580. Review.
- 140-** Foster G., Osterman B. S., Godfroid J., Jacques I., Cloeckaert A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57(Pt 11)** : 2688-2693.
- 141-** Fox E., Hunt K., O'Brien M., Jordan K. (2011). *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. *Int. J. Food. Microbiol.*, **145** : S39-S45.
- 142-** Freycon P. (2015). Rôle du Bouquetin *Capra ibex* dans l'épidémiologie de la brucellose à *Brucella melitensis* en Haute Savoie. Thèse présentée pour l'obtention du grade de *Docteur Vétérinaire*. Université Claude-Bernard – Lyon I. pp 190.
- 143-** Gabli A., Boulouis H. J., Remy D., Bouazziz O., Ouzrout O. (2005). Etude cinétique des cellules somatiques et analyses bactériologiques du lait de vaches en péripartum dans deux exploitations algériennes. *RASPA.*, **3** : 7-13.
- 144-** Gaillard J. L., Berche P., Sansonetti P. (1986). Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, **52** : 50-55.
- 145-** Gaillard J. L., Berche P., Frehel C. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram positive cocci. *Cell.*, **65** : 1127-1141.



- 146-** Gambo H., Agnem-Etchike C. (2001). Dépistage de mammites subcliniques chez les vaches goudali en lactation au nord Cameroun. *Rev.Elev.Méd.Vet Pays Trop.*, **54** : 5-10.
- 147-** Ganiere P., Dufour B. (2009). La brucellose animale, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, Merial (Lyon). 50p.
- 148-** Ganiere J. P., Thiry E., Gauthier D. (2015). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux « mesures de maîtrise de la brucellose chez les bouquetins du Bary ». Maisons-Alfort, le 22 juillet 2015. 194p.
- 149-** Gardner I. A., Stryhn H., Lind P., Collins M. T. (2000). Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.*, **45** : 107-122.
- 150-** Garin-Bastuji B. (2014). *Brucella* species and biovars. In : Rajala E. L. (2016) : *Brucella* in Tajikistan - Zoonotic Risks of Urbanized Livestock in a Low-Income Country. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. pp 66.
- 151-** Gasanov U., Hughes D., Hansbro P. M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria Monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29** : 851-875.
- 152-** Gedilaghine V. (2005). La rationalisation du traitement des mammites en exploitation laitière-conception et réalisation d'une enquête d'évaluation de la mise en place de l'action GTV partenaire dans le département de la manche, thèse pour le doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil. p 9-73.
- 153-** Gelbicova T., Karpiskova R. (2012). Outdoor environment as a source of *Listeria monocytogenes* in food chain. *Czech J. Food Sci.*, **30** : 83-88.
- 154-** Gerrit S. (2003). Dairy processing, Improving quality, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. 546 p.
- 155-** Gillespie S.H., Hawkey P.M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd. 604 p.

- 156-** Glaser P., Frangeul L., Buchrieser C., Rusniok C., Amend A., Baquero F., Berche P., Bloecker H., Brandt P., Chakraborty T., Charbit A., Chetouani F., Couve E., de Daruvar A., Dehoux P., Domann E., Dominguez-Bernal G., Duchaud E., Durant L., Dussurget O., Entian K. D., Fsihi H., Garcia-Del Portillo F., Garrido P., Gautier L., Goebel W., Gomez-Lopez N., Hain T., Hauf J., Jackson D., Jones L. M., Kaerst U., Kreft J., Kuhn M., Kunst F., Kurapkat G., Madueno E., Maitournam A., Vicente J. M., Ng E., Nedjari H., Nordsiek G., Novella S., de Pablos B., Perez-Diaz J. C., Purcell R., Rimmel B., Rose M., Schlueter T., Simoes N., Tierrez A., Vazquez-Boland J. A., Voss H., Wehland J., Cossart P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, **294** : 849-852.
- 157-** Godfroid J., Saegerman C., Wellemans V., Walravens K., Letesson J. J., Tibor A., McMillan A., Spencer S., Sanna M., Bakker D. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.*, **90** : 461-477.
- 158-** Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat. Med. J.*, **51** : 296-305.
- 159-** Godfroid J., Debolle X., Roop P., O'callaghan D., Tsolis R., Baldwin C., Santos R., Mcgiver J., Olsen S., Nymo I., Larsen A., Al Dahouk S., Letesson J. (2014). The quest for a true One Health perspective of Brucellosis, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **33** : 521-538.
- 160-** Goulet V., Hedberg C., Le Monnier A., de Valk H. (2008). Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg. Infect. Dis.*, **14(5)** : 734-740.
- 161-** Graves L. M., Helsel L. O., Steigerwalt A. G., Morey R. E., Daneshvar M. I., Roof S. E., Orsi R. H., Fortes E. D., Milillo S. R., den Bakker H. C., Wiedmann M., Swaminathan B., Sauders, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60** : 1280-1288.
- 162-** Guerini M. N., Brichta-Harhay D. M., Shackelford S. D., Arthur T. M., Bosilevac J. M., Kalchayanand N., Wheeler T. L., Koohmaraie M. (2007). *Listeria* prevalence and *Listeria monocytogenes* serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States. *J. Food Prot.*, **70** : 2578-2582 .
- 163-** Guiraud J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Edition Dunod. Paris. 652 p.

- 164-** Guiraud J. P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Ed. Dunod. Paris. ISBN 2 10 007259 5. 651p.
- 165-** Gupta V. K., Nayakwadi S., Kumar A., Gururaj K., Kumar A., Pawaiya R. S. (2014). Markers for the molecular diagnosis of brucellosis in animals. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, **2** : 31-39.
- 166-** Guyot H., Theron L., Frisee V., Hanzen C., Rollin F. (2014). Carnet clinique de médecine de troupeau. Université de Liège Faculté de Médecine vétérinaire – CVU Département des Animaux de production, Liège, 154 p.
- 167-** Guzman-Verri C., Gonzales-Barrientos R., Hernandez-Mora G., Morales J., Barquero-Calvo E., Chaves-Olarte E., Moreno E. (2012). *Brucella ceti* and Brucellosis in cetaceans. *Front. Cell. Inf. Microbiol.*, **2** : 3. doi :10.3389/fcimb.2012.00003.
- 168-** Gwida M., El-Ashker M., Melzer F., El-Diasty M., El-Beskawy M., Neubauer H. (2016). Use of serology and real time PCR to control an outbreak of bovine brucellosis at a dairy cattle farm in the Nile Delta region, Egypt. *Irish Vet. J.*, **69(3)** : PMC 4765200. doi: 10.1186/s13620-016-0062-9.
- 169-** Ha K. S., Park S. J., Seo S. J., Park J. H., Chung D. H. (2002). Incidence and polymerase chain reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeongnam Province of Korea. *J. Food Prot.*, **65** : 111-115.
- 170-** Hage E., Mpamugo O., Ohai C., Sapkota S., Swift C., Wooldridge D., Amar C. F. L. 2014. Identification of six *Listeria* species by real-time PCR assay. *Let. Appl. Microbiol.*, **58**: 535-540.
- 171-** Halter E. L., Neuhaus K., Scherer S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63** : 641-647.
- 172-** Hamann J., Zecconi A. (1998). Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *Bulletin of the IDF*. N° 334. 23 p.

- 173-** Hamdi T.M., Naïm M., Martin P., Jacquet C. (2007). Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria), *Int J Food Microbiol.*, 116 (2007) : 190–193.
- 174-** Hammani Kh. (2017). Manuel des Travaux Pratiques en Biologie Moléculaire (M32-SVI5). Université sidi mohammed ben abdellah de Taza, Fes. PP 16.
- 175-** Hanzen C. (2008). La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Approche individuelle Année 2007-2008 [http://eap.mcgill.ca/AgroBio/ab\\_head.htm](http://eap.mcgill.ca/AgroBio/ab_head.htm) date de consultation: 14/07/2013.
- 176-** Hanzen C. (2009). Propédeutique de la glande mammaire. Sémiologie et diagnostic individuel et de troupeau, Année 2008-2009.  
[http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes200809R21\\_Propedmammaire\\_symp\\_t\\_diagnostic\\_2009.pdf](http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes200809R21_Propedmammaire_symp_t_diagnostic_2009.pdf).
- 177-** Hars J., Richomme C., Riviere J., Payne A., Faure E., Boschioli M. L. (2013). La tuberculose bovine dans la faune sauvage en France. Risques pour l'élevage bovin. *Bull. Acad. Vet. Fr.*, **166(3)** : 222-228.
- 178-** Hartheiser M. (1994). La maîtrise de la contamination du lait par les spores butyriques. *Re. Méd. Vét.*, **170(6-7)** : 429-443.
- 179-** Havelaar A. H., Kirk M. D., Torgerson P. R., Gibb H. J., Hald T., Lake R. J., Praet N., Bellinger D. C., De Silva N. R., Gargouri N., Speybroeck N., Cawthorne A., Mathers C., Stein C., Angulo F. J., Devleeschauwer B. (2015). World Health Organization Global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Medicine*, **12(12)** : e1001923.
- 180-** Hebano H. A. (2013). Etude séro-épidémiologique de la brucellose animale dans la république de djibouti. Thèse de Docteur Vétérinaire. Université Cheikh Anta Diop De Dakar. pp 140.
- 181-** Hinić V., Brodard I., Thomann A., Holub M., Miserez R., Abril C. (2009). *IS711*-based real-time PCR assays as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Vet. Res.*, **5** : 22.

- 182-** Ho A. J., Ivanek R., Groehn Y. T., Nightingale K. K., Wiedmann M. (2007). *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. *Prev. Vet. Med.*, **80** : 287-305.
- 183-** Hogan J., Larry Smith K. (2003). Coliform mastitis. *Vet. Res.*, **34** : 507-519.
- 184-** Hough A. J., Harbison S. A., Savill M. G., Melton L. D., Fletcher G. (2002). Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, **65** : 1329–1332.
- 185-** Hubalek Z., Scholz H. C., Sedlacek I., Melzer F., Sanogo Y. O., Nesvadbova J. (2007). Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne Zoonotic Dis. Winter.*, **7(4)** : 679-687.
- 186-** Hunt K., Drummond N., Murphy M., Butler F., Buckley J., Jordan K. (2012). A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Irish Vet. J.*, **65(1)** : 13. Doi: 10.1186/2046-0481-65-13.
- 187-** Husu J. R. (1990). Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J. Vet. Med. Series B* **37(1-10)** : 276-282.
- 188-** Ibrahim N., Belihu K., Lobago F., Bekana M. (2010). Sero-prevalence of bovine brucellosis and its risk factors in Jimma zone of Oromia Region, South-western Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.*, **42** : 35-40.
- 189-** Iida T., Kanzaki M., Maruyama T., Inoue S., Kaneuchi C. (1991). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **53** : 873-875.
- 190-** INSP. (2007). Institut National de Santé Publique Algérie. Relevé épidémiologique annuel, Vol XVIII, N°5. 18 p.

- 191-** Institut de veille sanitaire. (2009). Nombre de listérioses déclarées par an et taux d'incidence annuel.  
([http://www.invs.sante.fr/surveillance/listeriose/cas\\_listeriose\\_1999\\_2009.pdf](http://www.invs.sante.fr/surveillance/listeriose/cas_listeriose_1999_2009.pdf))  
Accessed 27th February 2011.
- 192-** Iqbal Z., Jamil H., Qureshi Z. I., Saqib M., Lodhi L. A., Waqas M. S., Safdar M. (2013). Seroprevalence of ovine brucellosis by modified Rose Bengal test and ELISA in Southern Punjab, Pakistan. *Pak. Vet. J.*, **33(4)** : 455-457.
- 193-** Islam M. A., Akter L., Khatun M. M. (2013). Seroprevalence of Brucellosis and Its Associated Risk Factors in Bovine at Greater Mymensingh District of Bangladesh. *Microb. Health*, **2** : 12-14.
- 194-** Jagapur R. V., Rathore R., Karthik K., Somavanshi R. (2013). Seroprevalence studies of bovine brucellosis using indirect-enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) at organized and unorganized farms in three different states of India. *Vet. World.*, **6** : 550-553.
- 195-** Jamali H., Chai L. C., Thong K. L. (2013). Detection and isolation of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, **32** : 19-24.
- 196-** Janbon F. (2000). Brucellose. *Maladies Infectieuses, Encycl. Méd. Chir.*, **8-038-A-10** : 11 p.
- 197-** Jaradat Z. W., Schutze G. E., Bhunia A. K. (2002). Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *Int. J. Food Microbiol.*, **76** : 1-10.
- 198-** Jemmi T., Stephan R. (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **25** : 571-580.
- 199-** J.O. (1993). Journal officiel. Arrêté interministériel du 18 Août 1993, relatif aux spécifications et à la présentation des certains laits de consommation.

- 200-** JORA. (2017). Journal Officiel de la République Algérienne N° 39 du 8 Chaoual 1438 correspondant au 2 juillet 2017.
- 201-** JORADP. (2005). (Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire). N° 3, arrêté du 21 Châabane 1426 correspondant au 25 septembre 2005.
- 202-** JORF. (2015). Avis relatif à l'approbation par la Commission européenne de la modification du cahier des charges de l'appellation d'origine protégée « Reblochon » ou « Reblochon de Savoie ». *Journal officiel de la République Française*, 29 avril 2015.
- 203-** Jouan M. (2016). Prophylaxie de la brucellose humaine : vers une vaccination ciblée de la faune sauvage ? Etude du cas des bouquetins du massif du bargy. Thèse de docteur en pharmacie. Université grenoble alpes. Faculté de pharmacie de grenoble. pp 154.
- 204-** Juneja V. K., Foglia T. A., Marmer B. S. (1998). Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: effect of pH, acidulant, and growth temperature. *J. Food Prot.*, **61** : 683-687.
- 205-** Kabir A. (2015). Contraintes de la production laitière en Algérie et évaluation de la qualité du lait dans l'industrie laitière (constats et perspectives), Thèse de doctorat, spécialité : microbiologie. Université d'Oran. pp 195.
- 206-** Kaismoune N. (2009). *Listeria monocytogenes* et les produits alimentaires. Mémoire de stage de post-graduation spécialisée. (INATAA) Université Mentouri – Constantine. pp 92.
- 207-** Khaldi R., Naili A., (2001). Dynamique de la consommation de lait et de produits laitiers en Tunisie. In : Padilla M., Ben Saïd T., Hassainya J., Le Grusse P. "Les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée : état des lieux, problématique et méthodologie pour la recherche". Ciheam Montpellier, *Opt. Méd.*, série B **32** : 75-86.
- 208-** Kirk M. D., Pires S. M., Black R. E., Caipo M., Crump J. A., Devleeschauwer B., Döpfer D., Fazil A., Fischer-Walker C. L., Hald T., Hall A. J., Keddy K. H., Lake R. J., Lanata C. F., Torgerson P. R., Havelaar A. H., Angulo F. (2015). World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. *PLoS Medicine*, **12** : e1001921.



- 209-** Kitchen B. J. (1981). Review of the progress of Dairy Science : Bovine mastitis : milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.*, **48** : 167-188.
- 210-** Koch J., Dworak R., Prager R., Becker B., Brockmann S., Wicke A., Wichmann-Schauer H., Hof H., Werber D., Stark K. (2010). Large Listeriosis Outbreak Linked to Cheese Made from Pasteurized Milk, Germany, 2006-2007. *Foodborne Pathog. Dis.*, **7** : 1581-1584.
- 211-** Kocks C., Gouin E., Tabouret M. (1992). *Listeria monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, **68** : 521-531.
- 212-** Kuenne C., Voget S., Pischmarov J., Oehm S., Goesmann A., Daniel R., Hain T., Chakraborty T. (2010). Comparative analysis of plasmids in the genus *Listeria*. *PLoS One*, **5** : e12511. doi:12510.11371/journal.pone.0012511.
- 213-** Kuenne C., Billion A., Mraheil M. A., Strittmatter A., Daniel R., Goesmann A., Barbuddhe S., Hain T., Chakraborty T. (2013). Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics*, **14** : 47. Doi: 10.1186/1471-2164-14-47.
- 214-** Laaberki M. H., Ganiere J. P. (2017). La brucellose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Écoles Nationales Vétérinaires françaises, Merial, Lyon. 58 p.
- 215-** Labioui H., Elmoualdi L., Benzakour A., El Yachioui M., Berny Eh., Ouhssine M., (2009). Étude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **148** : 7-16.
- 216-** Lafleche P., Jacques Si., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoeud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L., Vergnaud G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, **6** : 9. Doi.org : 10.1186/1471-2180-6-9.
- 217-** Lamarche A., Martin B., Hauwuy A., Bapstistecoulon J., Poutrel B. (2000). Evolution of milk somatic cell cont of cows grazing an alpine pasture according to the infection of udder by pathogens. *Ann. Zootech.*, **49** : 45-54.

- 218-** Lapaque N., Moriyon I., Moreno E., Gorvel J. P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8** : 60-66.
- 219-** Larpent J. P. (2000). *Listeria*. 2<sup>ème</sup> édition. Lavoisier. p : 1-189.
- 220-** Laukova A., Marekova M. (2002). A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* EK13 against *Listeria innocua* in tofu. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. **53** : 28-30.
- 221-** Le Monnier A., Leclercq A. (2009). *Listeria* and listeriosis: From farm to fork. *Pathol. Biol.*, **57** : 17-22.
- 222-** Le Page Ph. (1999). Les cellulaires du lait et de la mamelle. *Journées nationales G. T. V.* INRA., Nantes/ 26-27-28 Mai 1999, 7-13.
- 223-** Lebres E., Mouffok F. (2000). *Enquête de listériose en Algérie*. Recueil de la journée: Face aux problèmes de l'été par Institut Pasteur d'Algérie. p. 11-22.
- 224-** Lebres E. H. A. (2002). Manuel des Travaux pratiques. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments. Unité : Microbiologie des laits et produits laitiers. *Institut Pasteur d'Algérie*. 31 p.
- 225-** Lebres E., Badis A., Mouffok F., Guetarni D., Ouzrout R. (2004). Contamination du lait cru de vache par *Listeria monocytogenes* : cas de quelques exploitations laitières. *Sci. et Techno.*, Algérie. **C – n°22** : 117 – 120.
- 226-** Lebres E. H. A. (2006). Etude de prévalence et analyse du risque de *Listeria monocytogenes* dans les laits crus dans la région centre. Thèse Doctorat en Sciences Vétérinaires. Option: Microbiologie. Centre Universitaire d'El Tarf, Algérie. pp 168.
- 227-** Lebre P., Berthelot X., Petit C. (1990). Les infections mammaires de la vache laitière, vol. II : *Applications opérationnelles*. Département des productions animales, ENVT.
- 228-** Lebrun M, Audurier A, Cossart P. (1994). Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cada* and *cadc* of *Staphylococcus-aureus* and are induced by cadmium. *J. Bacteriol.*, **176** : 3040-3048.

- 229-** Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P. A. D., Le Fleche-Mateos A., Roche S. M., Buchrieser C., Cadet-Daniel V., Le Monnier A., Lecuit M., Allerberger, F. (2010) *Listeria rocourtia* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60** : 2210-2214.
- 230-** Lecuit M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microb. Inf.*, **9** : 1216-1225.
- 231-** Lee C. S., Wooding F. B. P., Kemp P. (1980). Identification properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.*, **47** : 39-50.
- 232-** Lefevre P. C., Blancou J., Chermette R., (2003). Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail (Europe et Régions Chaudes). Editions Tec et Doc, Editions Médicales Internationale. Londre, Paris, NY.
- 233-** Leisner J. J., Larsen M. H., Jorgensen R. L., Brondsted L., Thomsen L. E., Ingmer H. (2008). Chitin hydrolysis by *Listeria spp.*, including *L. monocytogenes*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **74** : 3823-3830.
- 234-** Lemonnier C. (2015). Comparaison de trois techniques d'extraction d'ADN appliquées à l'étude des microorganismes marins. Compte-rendu de stage méthodologique. Université de Bretagne Occidentale. Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Master 2 recherche. pp28.
- 235-** Leray O. (1999). Méthodes de comptage des cellules du lait et contrôle qualité. *Journées nationales G. T. V.* INRA., Nantes/ 26-27-28 Mai 1999, 85-90.
- 236-** Lerondelle C. (1985). Les mammites à *Streptococcus uberis*. *Rec.Méd.Vét.*, **161(6-7)** : 539-544.
- 237-** Lessing M. P., Curtis G. D., Bowler I. C. (1994). *Listeria ivanovii* infection. *J Infect.*, **29** : 230-231.
- 238-** Lindahl E., Sattarov N., Boqvist S., Sattori I., Magnusson U. (2014). Seropositivity and risk factors for *Brucella* in dairy cows in urban and peri-urban small-scale farming in Tajikistan. *Trop. Anim. Health Prod.*, **46** : 563-569.

- 239-** Lindahl Rajala E., Hoffman T., Fretin D., Godfroid J., Sattorov N., Boqvist S., Lundkvist A., Magnusson U. (2017) Detection and characterization of *Brucella* spp. PLOS Neglected Trop. Dis, **11(3)** : e0005367.
- 240-** Liu D., Ainsworth A. J., Austin F. W., Lawrence M. L. (2004). Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, **91** : 297-304.
- 241-** Liu D., Lawrence M. L., Austin F. W., Ainsworth A. J. (2007). A multiplex PCR for species and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods.*, **71(2)** : 133-140.
- 242-** Low J. C., Donachie W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.*, **153** : 9-29.
- 243-** MacMillan A. (1990). Conventional serological test. In : Nielsen K., Duncan J. R., editors. *Animal brucellosis*. CRC Press, Boca Raton. PP. 153-197.
- 244-** Mai H. M., Irons P. C., Kabir J., Thompson P. N. (2012). A large seroprevalence survey of brucellosis in cattle herds under diverse production systems in northern Nigeria. *BMC Vet. Res.*, **8** : 144.
- 245-** Mailles A., Vaillant V. (2007). Etude sur les brucelloses humaines en France métropolitaine, 2002 – 2004. Institut de veille sanitaire. Département des maladies infectieuses. France Repro - Maisons-Alfort. <http://www.invs.sante.fr>
- 246-** Mailles A., Rautureau S., Le Horgne J. M., Poignet-Leroux B., D'arnoux C., Dennetiere G., Faure M., Lavigne J. P., Bru J. P., Garinbastuji B. (2012). Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. *Euro Surveill.*, **17(30)** : 13-15.
- 247-** Mamache B., Rabehi S., Méziane T. (2011). Antibacterial susceptibility profiles of subclinical mastitis pathogens isolated from cows in Batna and Setif governorates (East of Algeria). *Vet. World*, **4(12)** : 537-541.
- 248-** Mamache B., Rabehi S., Méziane T. (2014). Bacteriological Study of Subclinical Mastitis in Batna and Setif Governorates Algeria. *J. Vet. Adv.*, **4(2)** : 364-373.

- 249-** Mamisashvili E., Kracalik I. T., Onashvili T., Kerdzevadze L., Gogi-Nashvili K., Tigilauri T., Donduashvili M., Nikolaishvili M., Beradze I., Zakareishvili M., Kokhraidze M., Gelashvili M., Vepkhvadze N., Rácz S. E., Elzer P. H., Nikolich M. P., Blackburn J. K. (2013). Seroprevalence of brucellosis in livestock within three endemic regions of the country of Georgia. *Prev. Vet. Med.*, **110** : 554-557.
- 250-** Manchester K. L. (1996). «Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations» *Biotechniques*, **20** : 968–970.
- 251-** Mancilla M. (2016). Smooth to Rough Dissociation in *Brucella*: The Missing Link to Virulence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **5** : 98. doi: 10.3389/fcimb.2015.00098.
- 252-** Markey B., Finola L., Archambault M., Cullinane A., Maguire D. (2013). Clinical Veterinary Microbiology, Second Edition. *Mosby Elsevier*, Paris, 325-333.
- 253-** Martinez H. D., Lara A. N., Carrasco G. A., Peniche C. A., Barradas P. F. T., Villanueva V. M., Morales A. J. F., Flores C. R. (2008a). Uso de Ratones Albinos como modelo de Infección para el aislamiento de *Brucella abortus* a partir de leche. In : Memorias de la XXI Reunión Científica Tecnológica-Forestal y Agropecuaria Veracruz y del trópico mexicano. *Veracruz, México.* : 466-473.
- 254-** Martinez H. D., Padrón T. O., Salcedo G. M., Robledo S. M., Pulido C. E., Peniche C. A., Morales A. J. F., Flores C. R. (2008b). Histología de órganos parenquimatosos de ratonas albinas utilizadas como modelo de infección por *Brucella abortus*. In : Memorias de la XXI Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y del Trópico Mexicano. *Veracruz, Mexico.* : 450-457.
- 255-** Martirosyan A., Moreno E., Gorvel J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen, *Immunol. Rev.*, **240** : 211-234.
- 256-** Maurin M. (2005). La brucellose à l'aube du 21e siècle. *Méd. Malad. Infect.*, **35** : 6-16.
- 257-** Maurin M. (2007). *Brucella*. In : Freney J., Renaud F., Leclercq R., Riegel P. *Précis de Bactériologie Clinique*. Éd. ESKA, Paris, 1377-1385.

- 258-** Maurin M., Brion J.-P. (2009). Brucellose. In : *Encyclopédie médico-chirurgicale* (EMC), *Maladies infectieuses*. Éd. Elsevier Masson SAS, Paris, 8-038-A-10.
- 259-** McDermott J. J., Arimi S. M. (2002). Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet. Microbiol.*, **90** :111-134.
- 260-** McLauchlin J., Low J. C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults – an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet. Rec.*, **135** : 615-617.
- 261-** Megersa B., Biffa D., Abunna F., Regassa A., Godfroid J., Skjerve E. (2011). Seroprevalence of brucellosis and its contribution to abortion in cattle, camel, and goat kept under pastoral management in Borana, Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.*, **43** : 651-656.
- 262-** Megersa B., Biffa D., Abunna F., Regassa A., Godfroid J., Skjerve E. (2012). Seroepidemiological study of livestock brucellosis in a pastoral region. *Epidemiol. Inf.*, **140** : 887-896.
- 263-** Meissonnier E. (1995). Infections par les bactéries coliformes en période de tarissement chez les vaches laitières. *Bull. G. T. V.*, **4** : 9-16.
- 264-** Mekonnen H., Kalayou S., Kyule M. (2010). Serological survey of bovine brucellosis in barka and arado breeds (*Bos indicus*) of Western Tigray, Ethiopia. *Prev. Vet. Med.*, **94** : 28-35.
- 265-** Messadi L., Ben Miled L., Haddad N. (1991). Mammites bovines en Tunisie: bactéries responsables et antibiorésistance. *Re. Méd.Vét.*, **142** : 313-319.
- 266-** Meyer K.F., Shaw E.B. (1920) A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* studies on the genus *Brucella* Nov. Gen. *J. Infect. Dis.*, **27** : 173-184.
- 267-** Millet L., Saubusse M., Didiénne R., Tessier L., Montel M.C. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, **108**: 105-114.
- 268-** Mohammed H. O., Atwill E., Dunbar L., Ward T., McDonough P., Gonzalez R., Stipetic K. (2010). The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. *J. Appl. Microbiol.*, **108** : 349-356.

- 269-** Mokta K. K., Kanga A. K., Kaushal R. K. (2010). Neonatal listeriosis: A case report from sub-Himalayas. *Indian J. Med. Microbiol.*, **28** : 385-U167.
- 270-** Monsallier G. (1994). Maîtrise de la teneur en germes mésophiles totaux du lait à la production. *Rec.Méd.Vét.*, **170** : 411-418.
- 271-** Moreno E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front. microbiol.*, **5(213)** : 1-18.
- 272-** Morild R. K., Olsen J. E., Aabo S. (2011). Change in attachment of *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, and *Listeria monocytogenes* to pork skin and muscle after hot water and lactic acid decontamination. *Int. J. Food Microbiol.*, **145** : 353-358.
- 273-** Morillon M., Garnotel E. (2008). Listériose. *EMC (Elsevier Masson sas Paris) maladies infectieuses*, 8-017-R-10.
- 274-** Moroni O. (2007). Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria monocytogenes* : analyse *in vitro* et étude *in vivo* des mécanismes d'action antimicrobiens. Thèse de doctorat. Université Laval, Québec, QC, Canada. pp 146.
- 275-** Morvan A., Moubareck C., Leclercq A., Hervé-Bazin M., Bremont S., Lecuit M., Courvalin P., Le Monnier A. (2010). Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France. *Ant. Agents. Chemotherapy*, **56** : 2728-2731.
- 276-** Moshtaghi H., Mohamadpour A. A. (2007). Incidence of *Listeria* spp. in raw milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathog. Dis.*, **4** : 107-110.
- 277-** Mouffok C. (2007). Diversité des systèmes d'élevage bovin laitier et performances animales en région semi-aride de Sétif. Mémoire de magistère. Option : Sciences animale. INA. Algérie. pp 198.
- 278-** Muldoon P.J., Liska B.J. (1971). Chloride ion activity for detection of abnormal milk. *J. dairy Sci.*, **54 (1)** : 117-119.



- 279-** Murinda S. E., Nguyen L. T., Nan H. M., Almeida R. A., Headrick S. J., Oliver S. P. (2004). Detection of sorbitol-negative and sorbitol-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathog. Dis.*, **1** : 97-104.
- 280-** Murray E. G., Webb R. A., Swann M. B. (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed *bacillus bacterium monocytogenes*. *J. Path. Bacteriol.*, **29** : 407-439.
- 281-** Myllys V., Honkanen-Buzalski T., Huovinen P., Sandholm M., Nurmi E. (1994). Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machine and antibacterial drugs. *Acta Vet. Scand.*, **35(4)** : 363-369.
- 282-** Naim M. (1987). A propos d'un cas de listériose chez un immunodéprimé. Journées médico-chirurgicales. Hôpital Central de l'Armée. Alger.
- 283-** Needham J., Gwei-Djen L. (2000). *Science and Civilization in China*. Ed. Cambridge University Press, Cambridge, **6(6)** : 154.
- 284-** Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. (2003). Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** : 4753-4759.
- 285-** Nicoletti P. (2002). A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **90(1-4)** : 5-9.
- 286-** Nielsen J. S., Olsen A. S., Bonde M., Valentin-Hansen P., Kallipolitis B. H. (2008). Identification of a sigma(B)-dependent small noncoding RNA in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, **190** : 6264-6270.
- 287-** Nightingale K. K., Schukken Y. H., Nightingale C. R., Fortes E. D., Ho A. J., Her Z., Grohn Y. T., McDonough P. L., Wiedmann M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **70** : 4458-4467.

- 288-** Nightingale K. K., Fortes E. D., Ho A. J., Schukken Y. H., Grohn Y. T., Wiedmann M. (2005). Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **227** : 1808-1814.
- 289-** Noireterre P. (2006). Suivis de comptages cellulaires et d'examens bactériologiques lors de mammites cliniques chez la vache laitière. Etude expérimentale au centre d'élevage Lucien Bizet De Poisy. Thèse de Docteur Vétérinaire. L'université Claude-Bernard - Lyon I. pp 98.
- 290-** OIE. (2004). (Office International des Epizooties) – Chapitre 2.3.1: Bovine Brucellosis In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 13<sup>ème</sup> édition: 662-671p.
- 291-** OIE. (2005a). (Office International des Epizooties) Brucellose bovine. In : *Manuel terrestre de l'OIE*, 2005 : 457-488.
- 292-** OIE. (2005b). (Office International des Epizooties) *Chapitre 2.10.14.* - *Listeria monocytogenes*. In : *Manuel terrestre de l'OIE*, 2005 : 1249-1265.
- 293-** OIE. (2008). (Office International des Epizooties) - Chapitre 2.7.2. Manuel terrestre Brucellose ovine et caprine (Infection à *Brucella ovis* exclue). 1066-1075p.
- 294-** OIE. (2009). (Office International des Epizooties) Bovine brucellosis. Manual of Diagnostic. Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 586 Paris, France, pp. 1-35. [en ligne] : Accès Internet : [http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health\\_standards/tahm/2.04.03\\_bovine\\_brucell.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.04.03_bovine_brucell.pdf). (Consulté le 11/01/2014).
- 295-** OIE. (2016). L'Organisation mondiale de la santé animale *OIE Terrestrial manual. Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis)* (infection with *B. abortus, B. melitensis* and *B. suis*). Available from : [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.04\\_BRUCELLOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf). Accessed 12 October 2016.
- 296-** Oliver S. P., Jayarao B. M., Almeida R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.*, **2** : 1115–1129.

- 297-** OMS/FAO. (1999). Evaluation du risque microbiologique dans les aliments. pp 1-22.
- 298-** OMS. (2004). Manual of Diagnostic, Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.-13<sup>ème</sup> édition, Paris: OIE.-345p.
- 299-** Oteng-Gyang K., (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Editions : *Lavoisier*. 1-259 p.
- 300-** Ouedraogo M. (2001). Epidémiologie de la brucellose bovine : Modèle Bayésien de prédilection de la prévalence sur la base de tests combinés. Mémoire : Sciences de santé animale tropicale : Anvers, Institut Médecine Tropicale Prince Léopold. In : Adamou Harouna H. (2014). Évaluation de trois tests de dépistage de la brucellose bovine pour une aide décisionnelle de contrôle de la maladie dans le bassin laitier de niamey (niger). Mémoire de master en sante publique vétérinaire. École inter-etats des sciences et médecine vétérinaires de dakar, pp 44.
- 301-** Paape M., Vanoostveldt K., Meyer E. (1999). Défense phagocytaire de la glande mammaire bovine. *Journées nationales G. T. V. INRA.*, Mantes/ 26-27-28, Mai, 1999, 16-21.
- 302-** Pagan R., Condon S., Sala F. J. (1997). Effects of several factors on the heat-shockinduced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** : 3225-3232.
- 303-** Pagneux C. F. (2011). Effets de l'injection répétée d'hormone de croissance sur l'expression des gènes dans le muscle et les leucocytes circulant chez des juments de race poney-welsh. Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire. Faculté de Médecine de Créteil.
- 304-** Pan Y., Breidt F., Gorski L. (2010). Synergistic Effects of Sodium Chloride, Glucose, and Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76** : 1433–1441.
- 305-** Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, **6**(2) : 91-99.
- 306-** Percy A., Gautier D., Lecointre O., Crevat D., (1998). Diagnostic sérologique de la brucellose bovine. Evaluation Comparative d'une méthode ELISA et des Méthodes traditionnelles. *Rev.Elev.Méd .Vet Pays Trop.*, **149**(2) : 161- 168.

- 307-** Perrin Couilloud I. (1992). Staphylocoques et mammites bovines: importance des espèces différentes de *Staphylococcus aureus*, problèmes des échecs thérapeutiques. *Bull. G. T. V.*, **2B-420** : 7-12.
- 308-** Pesavento G., Ducci B., Nieri D., Comodo N., Lo Nostro A. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria spp.* isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*, **21(5)** : 708-713.
- 309-** Petrovski K., Trajcev M., Buneski G. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *J. South Afr. Vet. Assoc.*, **77** : 52 – 60.
- 310-** Piveteau, P., Depret, G., Pivato, B., Garmyn, D., Hartmann, A. (2011). Changes in gene expression during adaptation of *Listeria monocytogenes* to the soil environment. *PLoS One*, **6**: e24881. doi:24810.21371/journal.pone.0024881.
- 311-** Plommet M., Roguinsky M. (1968). Enquête sur les germes de mammites en 1967. *Bull. Acad.Vet.*, **41** : 213-221.
- 312-** Poester F., Samartino L., Santos R. (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **32** : 105-115.
- 313-** Portnoy D. A., Chakraborty T., Goebel W., Cossart P. (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.*, **60** : 1263-1267.
- 314-** Porto-Fett A. C. S., Pierre J., Shoyer B. A., Luchansky J. B. (2013). Effect of Storage Temperatures and Cooking Times on Viability of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 Inoculated in/on Goetta. *J. Food Saf.*, **33** : 128-136.
- 315-** Poutrel B. (1985). Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus, infection, épidémiologique, diagnostique, méthodes de contrôle. *Rec.Méd.Vét.*, **161(6-7)** : 497-511.
- 316-** Poutrel B. (2002). Actualités sur les méthodes de diagnostic des mammites. *Journées nationales G. T. V. INRA*, Tours : 157-162.
- 317-** Prasad N. D., Gupta R. K. (1990). *Listeria mocytoenes* in dairy products. An overview. *Microbiol. Alim. Nut.* **8**: 383-405.

- 318-** Queipo-Ortuño M. I., Colmenero J. D., Reguera J. M., García-Ordoñez M. A., Pachón M. E., Gonzalez M., Morata P. (2005). Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin. Microbiol. Inf.*, **11(9)** : 713-718.
- 319-** Rahal K. Ameer A. Bouyoucef A. Kaidi R. (2009). Epidémiologie des mammites chez les bovins laitiers, dans la région de la Mitidja. 7<sup>ème</sup> Journées des sciences vétérinaires, les maladies infectieuses des bovins, 18, 19 Avril, Algérie. Ecole Nationale Vétérinaire, El Harrach.
- 320-** Rahman A. A. K. M. (2015). Epidémiologie de la brucellose bovine chez les ruminants domestiques et chez l'homme au Bangladesh. Thèse de Docteur en Sciences Vétérinaires. Université de Liège. pp199.
- 321-** Raies Ul Islam M., Pratap Gupta M., Kaur Sidhu P., Folia G., Mohan Saxena H., Ahmed Shafi T. (2013). Comparative evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay, rose bengal plate test, microagglutination test, and polymerase chain reaction for diagnosis of brucellosis in buffaloes. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, **37** : 306-310.
- 322-** Ramdani – Bouguessa N., Rahal K. (2000). Neonatal listeriosis in Algeria: the first two cases. *Clin. Microbiol. Inf.*, **6(3)**: 108-111.
- 323-** Rapp C., Pulcini C., Tattevin P. *E.Pilly (2016). Maladies infectieuses et tropicales*. Éd. Collège des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales Alinea Plus, Paris, 2015. In : Jouan M. (2016). Prophylaxie de la brucellose humaine : vers une vaccination ciblée de la faune sauvage ? Etude du cas des bouquetins du massif du Bargy. Thèse de docteur en pharmacie. Université grenoble alpes. Faculté de pharmacie de grenoble. pp 154.
- 324-** RCRMB (Réseau Canadien de Recherche sur la Mammite Bovine), [en ligne] (2010) Adresse  
URL:[http://www.medvet.umontreal.ca/reseau\\_mammite/producteurs/index.php?page=outils](http://www.medvet.umontreal.ca/reseau_mammite/producteurs/index.php?page=outils).  
Consulté le 20 aout 2015.

- 325-** Renu-Karadhya G. J., Isloor S., Growther J. R., Robinson M., Rajasekhar M. (2001). Développement et validation sur le terrain d'une épreuve immuno enzymatique à l'avidine biotine pour le diagnostic de la brucellose bovine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **20(3)** : 749-756.
- 326-** Reyher K. K., Dufour S., Barkema H. W., Des Côteaux L., Devries T. J., Dohoo I. R., Keefe G. P., Roy J-P., Scoll D. T. (2011). The National Cohort of Dairy Farms—a data collection platform for mastitis research in Canada. *J. dairy Sci.*, **94** : 1616-1626.
- 327-** Riollet C., Rainard P., Poutrel B. (1999). Cinétique de recrutement cellulaire et de multiplication bactérienne après infection. *Journées nationales G. T. V. INRA.*, Nantes/ 26-27-28 Mai, 1999, 67-73.
- 328-** Rivas A. L., Quimby F. W., Blue J., Coksaygan O. (2001). Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13** : 399-407.
- 329-** Rivera A. D. Y., Rueda O. E., Calderon C. P., Mariño J. O. C., Gall D., Nielsen K. (2003). Evaluation comparative de la méthode immuno enzymatique indirecte sur le lait pour une détection des bovins infectés par *Brucella abortus*, dans des cheptels du département de Cundinamarca, Colombie. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **22(3)** : 1065-1075.
- 330-** Rocourt J, Wehmeyer U, Stackebrandt E. (1987). Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, **37**: 266-270.
- 331-** Rocourt J., BenEmbarek P., Toyofuku H., Schlundt J. (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol. and Med. Microbiol.*, **35** : 263-267.
- 332-** Rodriguez L. D., Vazquez Boland J. A., Fernandez Garayzabal J. F., Echalecu Tranchant P., Gomez-Lucia E., Rodriguez Ferri E. F., Suarez Fernandez G. (1986). Microplate technique to determine hemolytic activity for routine typing of *Listeria* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **24** : 99- 103.

- 333-** Roux J. (1989). Brucella in Le Minor L et Veron M. Bactériologie Médicale. Flammarion, Paris, édition 1989, 651-670 p.
- 334-** Roux V., Rolain J. M. (2014). Identification des bactéries par biologie moléculaire. In Chentouf H.F. (2015). Effet des substances antimicrobiennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* isolées à partir du lait de chamelle Algérien sur *Listeria* spp. dans les produits alimentaires. Thèse de doctorat, spécialité : microbiologie appliquée. Université d'Oran. pp 190.
- 335-** Rubach M. P., Halliday J. E., Cleaveland S., Crump J. A. (2013). Brucellosis in low-income and middle-income countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **26** : 404-412.
- 336-** Ryan K. J., Ray G. G. (2004). Sherris Medical Microbiology, An introduction to infectious diseases, 4th Edition. The McGraw-Hill Companies. 979 p.
- 337-** Saegerman C. (2007). Brucellose Master of Science en Santé Animale Tropicale Module<<Contrôle des maladies infectieuses>> Liège : ULg. 13 p.
- 338-** Saegerman C., Berkvens D., Godfroid J., Walravens K. (2010). Bovine brucellosis. In : Lefèvre P. C., Blancou J., Chermette R., Uilenberg G., editors. *Infectious and parasitic disease of livestock*. Paris, France. Lavoisier and Commonwealth Agricultural Bureau – International, pp. 971-1001.
- 339-** Sahin M., Genço., Ünver A., Otlu S. (2008). Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop. Anim. Health Prod.*, **40** : 281-286.
- 340-** Saleha S., Basit A., Rahim K., Shahid M., Khan M. A. (2014). Comparison of milk ring test; serum plate agglutination test and polymerase chain reaction for the detection of bovine brucellosis. *Res. j. vet. Pract.*, **2** : 5-8.
- 341-** Samaha H., Al-Rowaily M., Khoudair R. M., Ashour H. M. (2008). Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerg. Infect. Dis.*, **14(12)** : 1916-1918.
- 342-** Sanaa M. (1993). Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse Doctorat Univ. Paris XI. pp 207.



- 343-** Sanaa M., Menard J. L. (1994). Contamination du lait cru par *Listéria monocytogènes*: origines, facteurs de risque, prevention. *Rec.Méd.Vét.*, **170(6-7)** : 437-442.
- 344-** Sargeant J. M., Leslie K. E., Shirley J. E., Pulkrabek B. J., Lim G. H. (2001). Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection in Early Lactation. *J. dairy Sci.*, **84** : 2018–2024.
- 345-** Sayed M., Abdel-Azeem M., Farghaly M., Hassanein R. (2009). Using of PCR assay for identification of *Listeria monocytogenes* recovered from table eggs. *Vet. World*, **2(12)** : 453-455.
- 346-** Scallan E., Hoekstra R. M., Angulo F. J., Tauxe R. V., Widdowson M. A., Roy S. L., Jones J. L., Griffin P. M. (2011) Foodborne Illness Acquired in the United States Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, **17** : 7-15.
- 347-** Schalm O. W., Noorlander D. O. (1957). Experiments and observation leading to the development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **130** :199-204.
- 348-** Scholz H. C., Hubalek Z., Sedlacek I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F., Kämpfer P., Neubauer H., Cloeckaert A., Marquart M., Zygmunt M. S., Whatmore A. M., Falsen E., Bahn P., Göllner C., Pfeffer M., Huber B., Busse H. J., Nöckler K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58** : 375-382.
- 349-** Scholz H. C., Nöckler K., Göllner C., Bahn P., Vergnaud G., Tomaso H., Al-Dahouk S., Kämpfer P., Cloeckaert A., Marquart M., Zygmunt M. S., Whatmore A. M., Pfeffer M., Huber B., Busse H. J., De B. K. (2010). *Brucella inopinata* sp. Nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60(4)** : 801-808.
- 350-** Scholz H. C., Revilla-Fernández S., Al Dahouk S., Hammerl J. A., Zygmunt M. S., Cloeckaert A., Koylass M., Whatmore A. M., Blom J., Vergnaud G., Witte A., Aistleitner K., Hofer E. (2016). *Brucella vulpis* sp. Nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66** : 2090-2098.
- 351-** Schurig G. G., Sriranganathan N., Corbel M. J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, **90(1-4)** : 479-496.

- 352-** Schwarz N. G., Loderstaedt U., Hahn A., Hinz R., Zautner A. E., Eibach D., Fischer M., Hagen R. M., Frickmann H. (2015). Microbiological laboratory diagnostics of neglected zoonotic diseases (NZDs). *Acta tropic.*, doi: 10.1016/j.actatropica.2015.09.003.
- 353-** Scolamacchia F., Handel I. G., Fèvre E. M., Morgan K. L., Tanya V. N., Bronsvort B. M. D. C. (2010). Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. *PloS One*, **5** : e8623.
- 354-** Sears P. M., Mccarthy K. K. (2003). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. : Food Anim. Prac.* **19(1)** : 171-185.
- 355-** Seegers H., Menard J. L., Fourichon C. (1997). Mammites en élevage bovin laitier : importance actuelle, épidémiologie et plans de prévention. *Renc.Rech. Ruminants*, **4** : 233-242.
- 356-** Seegers H., Fourichon C., Horded P., Sorensen J. T., Billon D., Barilla N., Beaudeau F. (1999). Evaluation des conséquences économiques de différentes stratégies de maîtrise de la concentration du lait en cellules somatiques. Produit par un troupeau de vaches laitières. *Journées nationales G. T. V. INRA.*, Nantes/ 26-27-28 Mai, 1999, 169-178.
- 357-** Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.*, **34** : 475- 491.
- 358-** Seimenis A., Morelli D., Mantovani A. (2006). Zoonoses in the Mediterranean region. *Ann. Ist. Super. Sanita*, **42(4)** : 437-445. Review.
- 359-** Serieys F. (1985a). Concentration cellulaire du lait individuel de vache: influence de l'état d'infection mammaire, du numéro, du stade de lactation et de la production laitière. *Ann. Rech. Vét.*, **16(3)** : 255-261.
- 360-** Serieys F. (1985b). La numération des cellulaires du lait : interprétation pour le diagnostic et le suivi des infections mammaires. *Rec.Méd.Vét.*, **161** : 553-566.
- 361-** Serra J., Viñas M. (2004). Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain. *Int. Microbiol.*, **7** : 53-58.

- 362-** Shey Njila O. (2005). Sero-epidemiological study of bovine brucellosis in the region of Dschang (West Cameroon). Mémoire Sciences de santé animale tropicale : Anvers, Institut Médecine Tropicale Prince Léopold. In : Adamou Harouna H. (2014). Évaluation de trois tests de dépistage de la brucellose bovine pour une aide décisionnelle de contrôle de la maladie dans le bassin laitier de niamey (niger). Mémoire de master en sante publique vétérinaire. École inter-etats des sciences et médecine vétérinaires de dakar. pp 44.
- 363-** Shi W., Qingping W., Jumei Z., Moutong C., Zéan Y. (2015). Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control*, **47** : 340-347.
- 364-** Shim E., Shanks R., Morin D. (2004). Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *J. dairy Sci.*, **87** : 2702-2708.
- 365-** Smith B., Kemp M., Ethelberg S., Schiellerup P., Bruun B., Gerner-Smidt P., Christensen J. J. (2009). *Listeria monocytogenes*: Maternal-foetal infections in Denmark 1994-2005. *Scand. J. Infect. Dis.*, **41** : 21-25.
- 366-** Snapir Y. M., Vaisbein E., Nassar F. (2006). Low virulence but potentially fatal outcome-*Listeria ivanovii*. *Eur. J. Intern. Med.*, **17** : 286-287.
- 367-** Soleimani M. S., Shams K., Majidzadeh A. (2013). Developing a real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification assay as a rapid and accurate method for detection of Brucellosis. *J. Appl. Microbiol.*, **115** : 828-834.
- 368-** Soriano J. M., Rico H., Molto J. C., Manes J. (2001). *Listeria* species in raw and ready to eat foods from restaurants. *J. Food Prot.*, **64** : 551-553.
- 369-** Strawn L. K., Gröhn Y. T., Warchocki S., Worobo R. W., Bihn E. A., Wiedmanna M. (2013). Risk factors associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination of produce fields. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **79(24)** : 7618 –7627.
- 370-** SVA (Swedish. Veterinary Antimicrobial Resistance. Monitoring). (2011). *The national veterinary institute surveillance of zoonotic and other animal disease agents in Sweden 2010*. Report. www.sva.se (2011)

- 371-** Szulowski K., Iwaniak W., Weiner M., Zlotnicka J. (2013). *Brucella suis* biovar 2 isolations from cattle in Poland. *Ann. Agri. Envir. Med.*, **20(4)** : 672-675.
- 372-** Tabet-Derraz N. F., Bestaoui S. (2012). Epidémiologie et clinique de la brucellose humaine sur trois décennies en zone endémique. 13<sup>ème</sup> Journées Nationales d'infectiologie. CHU Hassani AEK, Service des maladies Infectieuses. Sidi-Bel-Abbés. Algérie. VINCI-centre international de congrès : 24 p.
- 373-** Tahery Y., Kafilzade F., Momtaz Y. A. (2009). *Listeria monocytogenesis* and abortion: A case study of pregnant women in Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **3** : 826-832.
- 374-** Theron L. (2014). Détection des mammites, actualité et perspectives. Observatoire de la santé mammaire (OSAM). In : Pirard B. (2015). Comparaison de tests cellulaires directs et indirects de détection de la mammite bovine. Mémoire de Master complémentaire en médecine vétérinaire spécialisée des animaux de production. Université de Liège. pp 28.
- 375-** Tourab D., Nezzal A. M., Gueroui S., Bachtarzi T. (1990). Épidémiologie de brucellose professionnelle dans la région de Annaba ». In : Lounes N. (2007). « Séroprévalence de la brucellose animale dans la région centre et impact sur la santé publique », mémoire de magister en sciences vétérinaires. Université Saad Dahleb-Blida. pp 284.
- 376-** Trangadia B., Rana S. K., Mukherjee F., Srinivasan V. A. (2010). Prevalence of brucellosis and infectious bovine rhinotracheitis in organized dairy farms in India. *Trop. Anim. Health Prod.*, **42** : 203-207.
- 377-** Trangadia B. J., Rana S. K., Nagmani K., Srinivasan V. A. (2012). Serological investigation of bovine brucellosis, Johnes disease and infectious bovine rhinotracheitis in two states of India. *J. Adv. Vet. Res.*, **2** : 38-41.
- 378-** Traum J. (1914). Report of the Chief of the Bureau of Animal Industry. *United States Department of Agriculture, Washington, DC*, 30.
- 379-** Vaillant V., de Valk H., Baron E., Ancelle T., Colin P., Delmas M. C., Dufour B., Pouillot R., Le Strat Y., Weinbreck P., Jouglu E., Desenclos J. C. (2005). Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog. Dis.*, **2** : 221-232.

- 380-** Van Kessel J. S., Karns J. S., Gorski L., McCluskey B. J., Perdue M. L. (2004). Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *J. dairy Sci.*, **87** : 2822-2830.
- 381-** Vardar-Ünlü G., Ünlü M., Bakici M. Z. (1998). Incidence of *Listeria* spp. from Raw Milk in Sivas. *Tr. J. Med. Sciences.* **28** : 389-392.
- 382-** Vazquez-Boland J. A., Dominguez L., Blanco M., Rocourt J., Fernandez-Garayzabal J.F., Gutierrez C. B., Tascón R. I., Rodriguez-Ferri E. F. (1992). Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new *Listeria*-selective enumeration medium and phage typing. *Am. J. Vet. Res.*, **53(3)** : 368-371.
- 383-** Vignola C. L. (2002). Science et technologie du lait. Ed : Ecole polytechnique de Montréal. P 600 (28-30).
- 384-** Viguier C., Arora S., Gilmartin N., Welbeck K., O'kenney R. (2009). Review : Mastitis detection: current trends and future perspectives, *Trends Biotechnol.*, **27(8)** : 486-493.
- 385-** Vilar M. J., Yus E., Sanjuan M. L., Dieguez F. J., Rodriguez-Otero J. L. (2007). Prevalence of and risk factors for *Listeria species* on dairy farms. *J. dairy Sci.* **90** : 5083–5088.
- 386-** Waak E., Tham W., Danielsson T. M. L. (2002). Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and dairy plant receiving tanks. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** : 3366 - 3370 .
- 387-** Wallemacq H., Girard B., Lekeux P., Bureau F. (2010). La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. *Ann.Méd.Vét.*, **154** : 16-29.
- 388-** Washington W. J., Stephen A., William J., Koneman E., Procop G., Scheckenberger P., editors. (2006). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams' & Wilkins; 765-773.
- 389-** Way S. S., Thompson L. J., Lopes J. E., Hajjar A. M., Kollmann T. R., Freitag N. E., Wilson C. B. (2004). Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell. Microbiol.*, **6** : 235-242.

- 390-** Welchman D. D., Hooton J. K., Low J. C. (1997). Ocular disease associated with silage feeding and *Listeria monocytogenes* in fallow deer. *Vet. Rec.*, **140** : 684-685.
- 391-** Weller D., Andrus A., Wiedmann M., den Bakker H. C. (2015). *Listeria booriae* sp nov and *Listeria newyorkensis* sp nov., from food processing environments in the USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65** : 286-292.
- 392-** Welshimer H. J., Meredith A. L. (1972). L-forms of *Listeria monocytogenes*. Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Erste Abteilung Originale Reihe A. *Med. Mikrobiol. Parasit.*, **219** : 105-108.
- 393-** Wesley I. V. (1999). Listeriosis in animals. In *Listeria, listeriosis and food safety*, 2nd edition. E T Ryser & E H Marth (eds). New York, N. Y.: Marcel Decker, Inc, p 39-73.
- 394-** Whatmore A. M., Davison N., Cloeckaert A., Al Dahouk S., Zygmunt M. S., Brew S. D., Perrett L. L., Koylass M. S., Vergnaud G., Quance C., Scholz H. C., Dick E. J., Hubbard G., Schlabritz-Loutsevitch N. E. (2014). *Brucella papionis* sp. Nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64** : 4120-4128.
- 395-** Whyte D., Walmsley M., Liew A., Claycomb R., Mein G. (2005). Chemical and rheological aspects of gel formation in the California mastitis test. *J. Dairy Res.*, **72** : 115-121.
- 396-** Wiedmann M., Bruce J. L., Keating C., Johnson A. E., McDonough P. L., Batt C. A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.*, **65** : 2707-2716.
- 397-** Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, **22** : 130-138.
- 398-** Wyatt H. V. (2005). How Themistocles Zammit found Malta fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. *J. R. Soc. Med.*, **98** : 451-454.
- 399-** Wyatt H. V. (2009). Brucellosis and Maltese goats in the Mediterranean. *J. Maltese Hist.*, **1** : 4-18.



- 400-** Wyatt H. V. (2011). The curious affair of the identity of Fioravanti Sammut (b.1863) and Temistocle Zammit (d.1935). *J. Med. Biogr.*, **19** : 128-131.
- 401-** Xavier M. N., Costa E. A., Paixão T. A., Santos R. L. (2009). Genus *Brucella* and clinical manifestation. *Ciênc.Rural*, **39(7)** : 2252-2260.
- 402-** Yu W. L., Nielsen K. (2010). Review of Detection of *Brucella spp.* by Polymerase Chain Reaction. *Croat. Med. J.*, **51** : 306-313.
- 403-** Zaika L. L., Fanelli J. S. (2003). Growth kinetics and cell morphology of *Listeria* Scott A as affected by temperature, NaCl, and EDTA. *J. Food Prot.*, **66** : 1208-1215.
- 404-** Zinsstag J., Roth F., Schelling E., Bonfoh B., (2003). Economie de lutte contre la Brucellose et ses applications pour l'Afrique : *Et. Rech. Sah.*, **(8-9)** : 51. In : Adamou Harouna H. (2014). Évaluation de trois tests de dépistage de la brucellose bovine pour une aide décisionnelle de contrôle de la maladie dans le bassin laitier de niamey (niger). Mémoire de master en sante publique vétérinaire. École inter-etats des sciences et médecine vétérinaires de dakar, pp 44.
- 405-** Zinsstag J., Schelling E., Roth F., Bonfoh B., De Savigny D., Tanner M. (2007). Human benefits of animal interventions for zoonosis control. *Emerg. Infect. Dis.*, **13(4)** : 527- 531.



## Résumé

*Brucella* spp. et *Listeria monocytogenes* sont des bactéries capables de se multiplier dans des compartiments intracellulaires. L'éradication des infections provoquées par ces bactéries exige la réalisation d'un bon diagnostic de laboratoire.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à évaluer la présence de *L. monocytogenes* et *Brucella* spp. dans le lait cru de vaches *Brucella*-séronégatives par l'usage de la technique de PCR, qui permet un diagnostic rapide, sensible et spécifique.

Dans le but de détecter la présence des *Brucella* spp. dans le lait cru, la PCR en temps réel a été utilisée en ciblant le gène IS711 (séquence répétée du génome). La PCR en temps réel se révèle plus rapide et plus sensible que les tests sérologiques, et la cible IS711 offre une meilleure sensibilité. Les résultats obtenus ont révélé la présence des *Brucella* spp. dans deux échantillons des 65 échantillons analysés, soit une prévalence de 3,08%.

La listériose est une anthroponose due à *L. monocytogenes*, seule espèce pathogène pour l'homme. Cette infection de transmission essentiellement alimentaire, se contracte par les denrées alimentaires destinées à être consommées directement sans subir une cuisson ou une autre transformation efficace. Les aliments les plus fréquemment incriminés dans les épidémies de listériose sont des produits alimentaires prêts à consommer comme certaines viandes ou les produits laitiers non pasteurisés, stockés pendant une longue durée, même à l'état réfrigéré. C'est d'ailleurs pour cette raison que *L. monocytogenes* est utilisée comme indicateur d'hygiène dans toutes les étapes de la chaîne de transformation alimentaire.

Compte tenu de l'importance de cette espèce et l'impact sanitaire qu'elle représente, ce sujet vise à évaluer la présence de *L. monocytogenes* dans le lait cru par la détection de gène *hlyA* par la méthode de la PCR en temps réel. Les résultats obtenus étaient négatifs pour tous les échantillons analysés, la prévalence de *L. monocytogenes* dans les 65 échantillons collectés dans cette étude est de 0%.

**Mots clés :** Lait cru, PCR en temps réel, *Brucella*, Gène IS711, *Listeria monocytogenes*, Gène *hlyA*,

## ملخص

البكتيريا *Listeria monocytogenes* و *Brucella spp.* قادرة على التكاثر في الأجزاء داخل الخلايا. يتطلب استئصال العدوى التي تسببها هذه البكتيريا الحصول على تشخيص مخبري جيد.

في هذه الأطروحة ، نحن مهتمون بتقييم وجود *Listeria monocytogenes* و *Brucella spp.* في الحليب الأبقار الطازج في منطقة باننة.

يحتوي جنس *Brucella spp.* بروسيلا على 12 نوعاً التي تصيب الحيوانات والبشر بطريق الخطأ. لغرض الكشف عن وجود *Brucella spp.* في الحليب الطازج ، تم استخدام PCR في الوقت الحقيقي من خلال استهداف جين IS711 (تسلسل متكرر من الجينوم). في الوقت الحقيقي PCR هو أسرع وأكثر حساسية من الاختبارات المصلية ، وهدف IS711 حساسية أفضل. النتائج التي تم الحصول عليها كشفت عن وجود *Brucella spp.* في عينتين من 65 عينة تم تحليلها.

Listeriosis هو داء الأنثروبوزونات الذي تسببه *Listeria monocytogenes* ، وهو النوع الوحيد الممرض في البشر. تنتقل العدوى التي تنقلها الأغذية في المقام الأول عن طريق المواد الغذائية المعدة للاستهلاك مباشرة دون الخضوع للطبخ أو المعالجة الفعالة الأخرى. إن الأغذية الأكثر تكراراً في تفشي مرض الليستيريات هي أطعمة جاهزة للأكل مثل بعض اللحوم غير المبستر أو منتجات الألبان (حليب الطازج) المخزنة لفترة طويلة ، حتى إذا كانت مبردة عند 4 درجات مئوية . ولهذا السبب يستخدم *Listeria monocytogenes* كمؤشر للصحة العامة في جميع مراحل سلسلة تجهيز الأغذية.

ونظراً لأهمية هذا النوع من التأثيرات والأثر الصحي الذي يمثله ، يهدف هذا الموضوع إلى تقييم وجود *Listeria monocytogenes* في الحليب الطازج عن طريق الكشف عن جين الجين بواسطة طريقة PCR في الوقت الحقيقي. النتائج التي تم الحصول عليها كانت سلبية لجميع العينات التي تم تحليلها ، وبالتالي فإن انتشار *Listeria monocytogenes* في العينات الـ 65 التي تم جمعها في هذه الدراسة هو 0 %.

الكلمات المفتوحة: الحليب الطازج ، والكشف المحدد لجنس *Brucella spp.* ، في الوقت الحقيقي PCR ، الجين IS711 ، والكشف عن محددة من *Listeria monocytogenes* ، جين *hlyA* ،

## Abstract

*Listeria monocytogenes* and *Brucella* spp. are bacteria capable of multiplying in intracellular compartments. The eradication of infections caused by these bacteria requires the achievement of a good laboratory diagnosis.

In this thesis, we are interested in evaluating the presence of *Listeria monocytogenes* and *Brucella* spp. in raw milk from *Brucella*-seronegative cows through the use of a rapid, sensitive and specific diagnosis.

The genus *Brucella* includes 12 species infecting animals and accidentally humans. For the purpose of detecting the presence of *Brucella* spp. in raw milk, real-time PCR was used by targeting the IS711 gene (repeated sequence of the genome). Real-time PCR is faster and more sensitive than serological tests, and the IS711 target offers better sensitivity. The results obtained revealed the presence of *Brucella* spp. in tow samples of 65 samples analyzed, so the prevalence of *Brucella* spp. in the 65 samples collected in this study is 3,08%.

Listeriosis is an anthroozoonosis caused by *Listeria monocytogenes*, the only pathogenic species in humans. This primarily food-borne transmission infection is contracted by foodstuffs intended to be consumed directly without undergoing cooking or other effective processing. The foods most frequently implicated in listeriosis outbreaks are ready-to-eat foods such as certain unpasteurized meats or dairy products (raw milk case) stored for a long time, even if refrigerated at 4 ° C. It is for this reason that *Listeria monocytogenes* is used as an indicator of hygiene in all stages of the food processing chain.

Given the importance of this species and the health impact it represents, this subject aims to evaluate the presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk by the detection of *hlyA* gene by the real-time PCR method. The results obtained were negative for all the samples analyzed, so the prevalence of *Listeria monocytogenes* in the 65 samples collected in this study is 0%.

**Keywords:** Raw milk, Specific detection of *Brucella* genus, Real-time PCR, IS711 gene, Specific detection of *Listeria monocytogenes*, Gene *hlyA*,

## Annexe N° 1

## a. Agrément et rapport d'essai du laboratoire vétérinaire régional de Constantine pour l'exploitation N°1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
 MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DU DEVELOPPEMENT RURAL ET DE LA PECHE  
 WILAYA DE.....BATNA.....  
 DIRECTION DES SERVICES AGRICOLES DE LA WILAYA DE BATNA  
 INSPECTION VETERINAIRE DE LA WILAYA  
 N° :...039...../IVW/2016

AGREMENT SANITAIRE D'UN ELEVAGE BOVINTYPE DE L'EXPLOITATION  A  B  C

La durée de validité est de 0 6 mois

Je soussigné (e) docteur...~~ABDELMAJID KHALIL~~.....N°A.V.N.....90150.....  
 Grade ...DOCTEUR VETERINAIRE ...Avoir inspecté ce jour le .....28/11/2016.....  
 L'établissement d'élevage bovin appartenant à .....~~SILVAIN M'RAHAT~~.....  
 Adresse.....DJERMA.....  
 Statut social de l'établissement (1).....Assuré à .....police N°.....

ATTESTE QUE

- 1)-Cet établissement d'élevage est conforme en matière d'hygiène et de normes d'élevage ,sa capacité est de .....//.....//.....bovins.
- 2)-Les bovins sont vaccinés contre la rage, les diarrhées néonatales et la fièvre aphteuse.
- 3)- Cet élevage est indemne de maladies contagieuses, notamment la brucellose et la tuberculose.
- 4)- Ces animaux sont indemnes de leucose (2) et indemne de mammites (3).
- 5)- Le nombre de bovins dépistés: / 2 / 1 / en lettre ..... VINGT ET UN.....Race .....
- 6)- Le nombre de vaches en production laitière: / 0 / 2 / 1 / en lettre..... VINGT ET UN.....

En foi de quoi ,cet établissement est agréé sous le N° :

/ 0 / 5 / 1 / 8 / 5 / 1 / 3 / S / M / 0 / 0 / 3 / 9 /

Visa du Dr vétérinaire  
~~DR ABDELMAJID KHALIL~~  
 Inspecteur vétérinaire  
 N°A.V.N 90150

Fait à...BATNA.....le 28/12/2016....

Visa de l'inspecteur vétérinaire de wilaya

المفتش البيطري للولاية  
 رشيد بن معمري  
 A. V. N N° : 88145

Le directeur des services agricoles

ع / وزير الفلاحة والتنمية الريفية و الصيد البحري  
 و بتفويض منه مدير المصالح الفلاحية  
 نولاية باتنة  
 كمال الدين بن صفتير

NB: Ce présent agrément peut être modifié, suspendu, annulé dans le cas ou le statut sanitaire devient défavorable il peut être aussi annulé lors de toutes fraudes constatées sur la quantité et la qualité du lait

- (1) : privé(P), office(O), ferme pilote(F), coopérative(C), société(S)  
 (2) : pour l'exploitation A et B, (3) pour l'exploitation A



INSTITUT NATIONAL DE LA MEDECINE VETERINAIRE

N° Dossier : 3463

Laboratoire Vétérinaire Régional de Constantine

## RAPPORT D'ESSAI

N° Dossier : 3463

Date de réception : 29/11/2016

Référence : 1629/LVRC/2016

Date de l'échantillonnage : 28/11/2016

## Vétérinaire

Nom: [REDACTED] Prénom: [REDACTED]  
 AVN: 0090150 Tel/Fax:  
 Adresse: SDA EL MADHER / BATNA

## Propriétaire

Nom: [REDACTED] Prénom: [REDACTED]  
 Raison Sociale: Eleveur N° Agrément: /  
 Tel/Fax: Adresse: DJERMA / BATNA

## Prélèvement et échantillon

Nombre : 21 Origine : Contrôle local  
 Pays : DSI :  
 Wilaya : BATNA Commune : DJERMA  
 Lieu:

Le résultat du bulletin d'analyse ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse (Norme EN 17025)

## Bactériologie Sérologie

Identifiant: 00200; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age: /; Sexe: /; Race: /

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 0146; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age: /; Sexe: /; Race: /

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 1292; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age: /; Sexe: /; Race: /

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Ce document ne peut être utilisé, reproduit ou communiqué sans autorisation du laboratoire  
 @Mail: lvr\_constantine@inmv.edu.dz N° Téléphone: 031801153 N° Fax: 031801153

1/4

11/12/2016

N° Dossier :3463

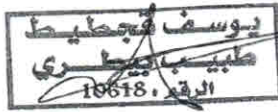
Identifiant: 9704; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age:/; Sexe;; Race:/

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

(94) Identifiant: 9884; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age:/; Sexe;; Race:/

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

P / chef de service  
 مدير المختبر البيطري  
 الجهوي بقسنطينة  
 الحكيمه حيول امال  
 طبيبة بيطرية رئيسية  
 AVN: 94512



Ce document ne peut être utilisé, reproduit ou communiqué sans autorisation du laboratoire  
 @Mail: lvr\_constantine@inmv.edu.dz N°Téléphone:031801153 N°Fax:031801153



b. Agrément et rapport d'essai du laboratoire vétérinaire régional de Constantine pour l'exploitation N°2

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
 MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DU DEVELOPPEMENT RURAL ET DE LA PECHE  
 WILAYA DE.....BATNA.....  
 DIRECTION DES SERVICES AGRICOLES DE LA WILAYA DE BATNA  
 INSPECTION VETERINAIRE DE LA WILAYA  
 N° :...045...../IVW/2016

**AGREMENT SANITAIRE D'UN ELEVAGE BOVIN**

TYPE DE L'EXPLOITATION  A  B  C

La durée de validité est de 0 6 mois

Je soussigné (e) docteur...~~ABDELMALEK SMA~~.....N°A.V.N.....90150.....  
 Grade ...DOCTEUR VETERINAIRE ...Avoir inspecté ce jour le .....04/12/2016.....  
 L'établissement d'élevage bovin appartenant à .....~~SALDANI AHMED~~.....  
 Adresse.....DJERMA.....  
 Statut social de l'établissement (1).....Assuré à .....police N°.....

**ATTESTE QUE**

- 1)-Cet établissement d'élevage est conforme en matière d'hygiène et de normes d'élevage, sa capacité est de .....//...../.....//.....bovins.
- 2)-Les bovins sont vaccinés contre la rage, les diarrhées néonatales et la fièvre aphteuse.
- 3)- Cet élevage est indemne de maladies contagieuses, notamment la brucellose et la tuberculose.
- 4)- Ces animaux sont indemnes de leucose (2) et indemne de mammites (3).
- 5)- Le nombre de bovins dépistés: / 3 / 2 / en lettre ..... TRENTE DEUX.....Race .....
- 6)- Le nombre de vaches en production laitière: / 0 / 3 / 1 / en lettre..... TRENTE ET UN...

En foi de quoi, cet établissement est agréé sous le N° :

/ 0 / 5 / 1 / 8 / 5 / 1 / 3 / S / A / 0 / 0 / 4 / 5 /

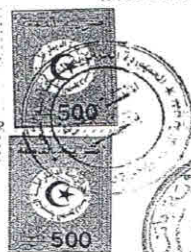
Visa du Dr vétérinaire

~~Dr. ABDELMALEK SMA~~  
 Inspecteur  
 IVW 90150

Visa de l'inspecteur vétérinaire de wilaya

المفتش البيطري للولاية  
 رشيد بن معمري  
 A.V.N N°: 188145

Fait à...BATNA.....le 28/12/2016....



Le directeur des services agricoles

ع / وزير الفلاحة والصيد البحري والتنمية الريفية والصيد البحري  
 وبتفويض منه مدير المصالح الفلاحية  
 لولاية باتنة  
 كمال الدين بن صغير

NB: Ce présent agrément peut être modifié, suspendu, annulé dans le cas où le statut sanitaire devient défavorable il peut être aussi annulé lors de toutes fraudes constatées sur la quantité et /la qualité du lait

- (1) : privé(P), office(O), ferme pilote(F), coopérative(C), société(S)  
 (2) : pour l'exploitation A et B, (3) pour l'exploitation A





INSTITUT NATIONAL DE LA MEDECINE VETERINAIRE

N° Dossier : 3684

Laboratoire Vétérinaire Régional de Constantine

## RAPPORT D'ESSAI

N° Dossier: 3684

Référence : 1707/LVRC/2016

Date de réception: 11/12/2016

Date de l'échantillonnage: 04/12/2016

## Vétérinaire

Nom: [REDACTED] Prénom: [REDACTED]  
 AVN: 0090150 Tel/Fax:  
 Adresse: SDA EL MADHER / BATNA

## Propriétaire

Nom: [REDACTED] Prénom: [REDACTED]  
 Raison Sociale: Eleveur N° Agrément: /  
 Tel/Fax: Adresse: DJERMA BATNA

## Prélèvement et échantillon

Nombre : 32 Origine : Contrôle local  
 Pays : DSI :  
 Wilaya : BATNA Commune : DJERMA  
 Lieu:

Le résultat du bulletin d'analyse ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse (Norme EN 17025)

## Bactériologie Sérologie

Identifiant: 25214; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age:: Sexe:: Race:

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 25215; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age:: Sexe:: Race:

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 25216; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age:: Sexe:: Race:

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Ce document ne peut être utilisé, reproduit ou communiqué sans autorisation du laboratoire  
 @Mail: lv\_constantine@inmv.edu.dz N°Téléphone:031801153 N° Fax:031801153

N° Dossier :3684

Identifiant: 25241; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age;; Sexe;; Race:

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 25242; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age;; Sexe;; Race:

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 25243; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age;; Sexe;; Race:

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 25244; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age;; Sexe;; Race:

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 25245; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age;; Sexe;; Race:

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

د. ح. كوتشوك علي  
 طبيب بيطري رئيسي  
 AVN: 88256  
 رئيس قسم البكتريولوجيا

مدير المخبر البيطري

الجهوي بقسنطينة

الحكيمة حيورا أماز

طبيبة بيطرية رئيسية

AVN : 94512



Ce document ne peut être utilisé, reproduit ou communiqué sans autorisation du laboratoire  
 @Mail: lvr\_constantine@inmv.edu.dz N°Téléphone:031801153 N°Fax:031801153

c. Agrément et rapport d'essai du laboratoire vétérinaire régional de Constantine pour l'exploitation N°3

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
 MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DU DEVELOPPEMENT RURAL ET DE LA PECHE  
 WILAYA DE.....BATNA.....  
 DIRECTION DES SERVICES AGRICOLES DE LA WILAYA DE BATNA  
 INSPECTION VETERINAIRE DE LA WILAYA  
 N° :...043...../IVW/2016

**AGREMENT SANITAIRE D'UN ELEVAGE BOVIN**  
 TYPE DE L'EXPLOITATION  A  B  C

La durée de validité est de 0 6 mois

Je soussigné (e) docteur...~~EDMALEK SMAEL~~.....N°A.V.N.....90150.....  
 Grade ...DOCTEUR VETERINAIRE ...Avoir inspecté ce jour le .....21/11/2016.....  
 L'établissement d'élevage bovin appartenant à .....~~LADJILAN~~.....  
 Adresse.....AIN YAGOUT.....  
 Statut social de l'établissement (1).....Assuré à .....police N°.....

**ATTESTE QUE**

- 1)-Cet établissement d'élevage est conforme en matière d'hygiène et de normes d'élevage ,sa capacité est de .....//...../.....//.....bovins.
- 2)-Les bovins sont vaccinés contre la rage, les diarrhées néonatales et la fièvre aphteuse.
- 3)- Cet élevage est indemne de maladies contagieuses, notamment la brucellose et la tuberculose.
- 4)- Ces animaux sont indemnes de leucose (2) et indemne de mammites (3).
- 5)- Le nombre de bovins dépistés: /\_ 2 / 8 /\_ en lettre ..... VINGT HUIT.....Race .....
- 6)- Le nombre de vaches en production laitière: /\_ 0 / 2 / 8 /\_ en lettre..... VINGT HUIT.....

En foi de quoi ,cet établissement est agréé sous le N° :

/\_ 0 / 5 / 1 / 8 / 5 / 2 / 2 / H / L / 0 / 0 / 4 / 3 /

Visa du Dr vétérinaire  
~~DE ABDELKADER BELKACEM~~  
 Inspecteur Vétérinaire  
 N° 90150

Fait à...BATNA.....le 28/12/2016....

Visa de l'inspecteur vétérinaire de wilaya

المفتش البيطري للولاية  
 رشيد بن لعماري  
 A.V.N N°: 88145



Le directeur des services agricoles



NB: Ce présent agrément peut être modifié, suspendu, annulé dans le cas où le statut sanitaire devient défavorable il peut être aussi annulé lors de toutes fraudes constatées sur la quantité et la qualité du lait

(1) : privé(P), office(O), ferme pilote(F), coopérative(C), société(S)

(2) : pour l'exploitation A et B, (3) pour l'exploitation A



INSTITUT NATIONAL DE LA MEDECINE VETERINAIRE

N° Dossier : 3352

Laboratoire Vétérinaire Régional de Constantine

## RAPPORT D'ESSAI

N° Dossier: 3352

Date de réception: 21/11/2016

Référence : 1574/LVRC/2016

Date de l'échantillonnage: 21/11/2016

## Vétérinaire

Nom: [REDACTED] Prénom: [REDACTED]  
 AVN: 0090150 Tel/Fax:  
 Adresse: SDA EL MADHER / BATNA

## Propriétaire

Nom: [REDACTED] Prénom: [REDACTED]  
 Raison Sociale: Eleveur N° Agrément: /  
 Tel/Fax: Adresse: AIN YAGOUT/BATNA

## Prélèvement et échantillon

Nombre : 28 Origine : Contrôle local  
 Pays : DSI :  
 Wilaya : BATNA Commune : AIN YAGOUT  
 Lieu:

Le résultat du bulletin d'analyse ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse (Norme EN 17025)

## Bactériologie Sérologie

Identifiant: 522/001; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age: /; Sexe: /; Race: /

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 522/002; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age: /; Sexe: /; Race: /

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Identifiant: 522/003; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age: /; Sexe: /; Race: /

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

Ce document ne peut être utilisé, reproduit ou communiqué sans autorisation du Laboratoire  
 @Mail: lvr\_constantine@inmv.edu.dz N° Téléphone: 031801153 N° Fax: 031801153

13

05/12/2016

N° Dossier : 3352

Identifiant: 522/028; Espèce: Bovine; Nature: Sang total; Age: /; Sexe: /; Race: /

Maladie	Agent	Technique	Résultat	Observation
Brucellose	Brucella	EAT ( Rose Bengale )	Négative	

د. ح. طوشواوك علي  
 طبيب باطني  
 AVN : 88256  
 رئيس قسم البكتريولوجيا

عدير المخبر البيطري  
 الجهوي بقسنطينة  
 الحكومية جبول أمال  
 طبيبة بيطرية رئيسية  
 AVN : 94512





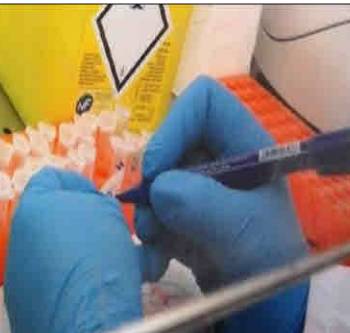





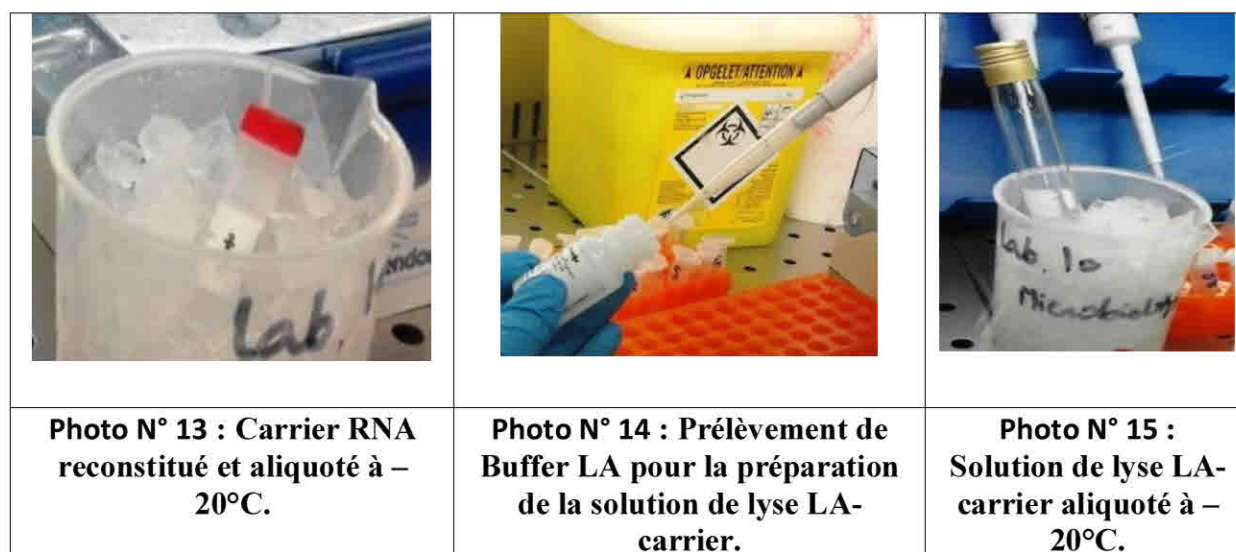
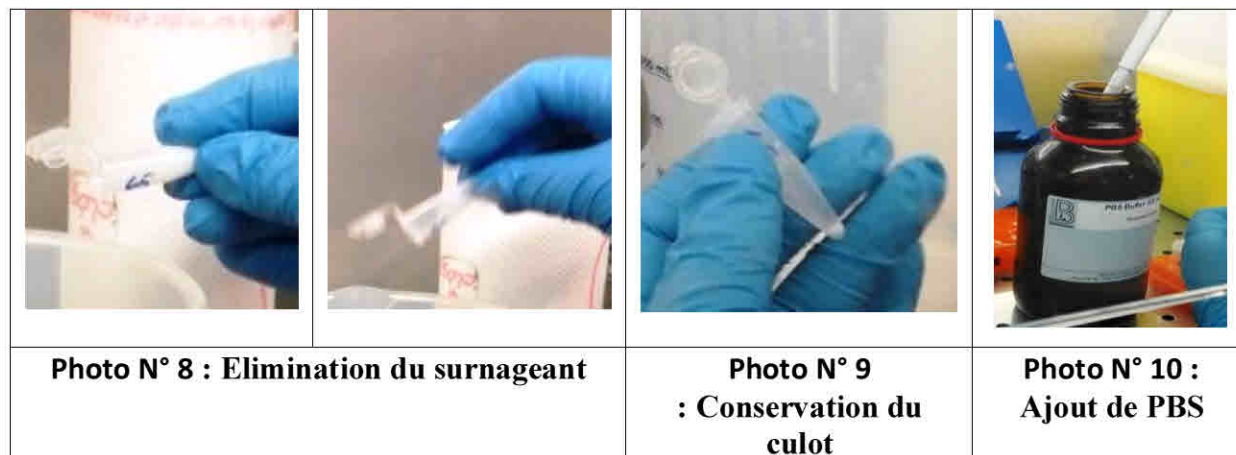
Ce document ne peut être utilisé, reproduit ou communiqué sans autorisation du laboratoire  
 @Mail: lvr\_constantine@inmv.edu.dz N°Téléphone:031801153 N°Fax:031801153



## Annexe N° 2

Photos de la partie expérimentale (extraction d'ADN, leur quantification et la réalisation de la PCR en temps réel).

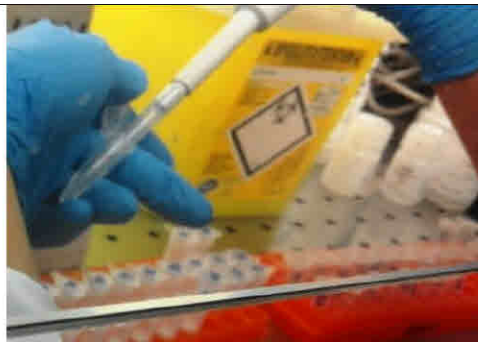
		
<p><b>Photo N° 1 : Poste Sécurité Microbiologique classe II : Stérile – VBH</b></p>	<p><b>Photo N° 2 : Centrifugeuse de bureau (Centri-boule).</b></p>	
		
<p><b>Photo N° 3 : Durant l'extraction, le lait est maintenu dans de la glace pilée.</b></p>	<p><b>Photo N° 4 : Double emballage des prélèvements, et homogénéisation du lait avant la prise d'essai.</b></p>	<p><b>Photo N° 5 : Identification des tubes de 1,5 ml avec le nom de l'échantillon à extraire</b></p>
		
<p><b>Photo N° 6 : Prise d'essai</b></p>	<p><b>Photo N° 7 : Séparation du lait en deux couches après centrifugation.</b></p>	







**Photo N° 16 :  
Protéinase K**



**Photo N° 17 : Prélèvement du lait  
prétraité**



**Photo N° 18 : Solutions du  
kit d'extraction.**



**Photo N° 19 : Chargement  
des colonnes BioExtract®  
Mini Spin Column.**



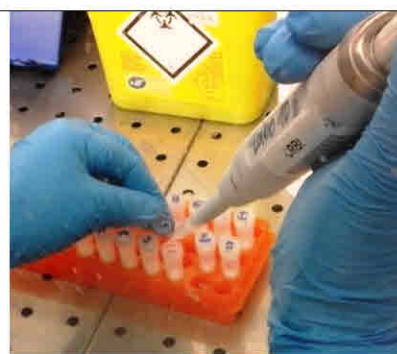
**Photo N° 20 : Lavage de  
l'ADN extrait par Buffer  
W1.**



**Photo N° 21 : Lavage de  
l'ADN extrait par Buffer  
W2.**



**Photo N° 22 : Séchage de la  
membrane de silice par  
centrifugation.**



**Photo N° 23 : Dépôt de  
Buffer EL au centre de la  
membrane de silice.**



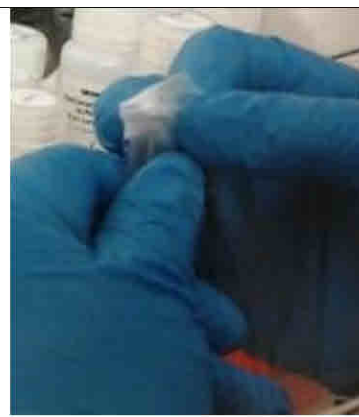
**Photo N° 24 : ADN élué  
après centrifugation.**



**Photo N° 25 : Elimination de la colonne BioExtract® Mini Spin Column.**



**Photo N° 26 : Récupération de l'ADN.**



**Photo N° 27 : Fermeture du tube par un parafilm**



**Photo N° 28 : Ajout de l'ARNase**



**Photo N° 29 : Incubation de l'ADN extrait**



**Photo N° 30 : Extrait d'ADN**



**Photo N° 31 : Conservation de l'ADN extrait et Kits de détection dans un congélateur à -20°C.**

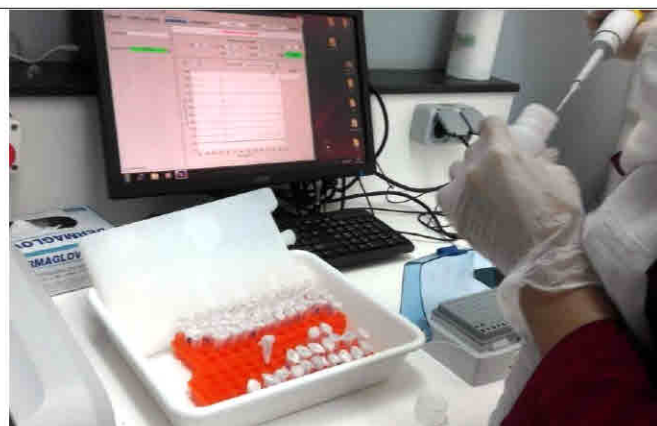




**Photo N° 32 : NanoDrop relié à un microordinateur**



**Photo N° 33 : NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).**



**Photo N° 34 : Pose de l'essai à blanc.**



**Photo N° 35 : Nettoyage des deux surfaces optiques avec un papier absorbant.**



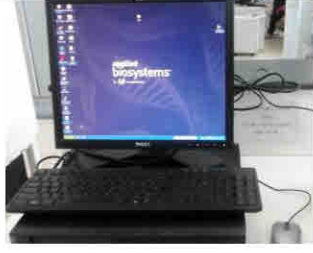



**Photo N° 36 : Dépôt de 1  $\mu$ l de l'échantillon de l'ADN dans la cellule de l'appareil.**









**Photo N° 37 : Bras du levier abaissé**

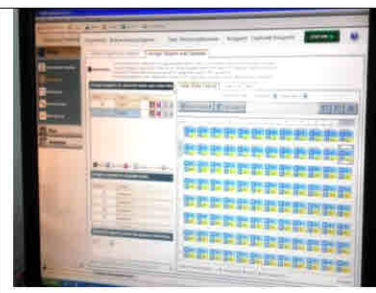

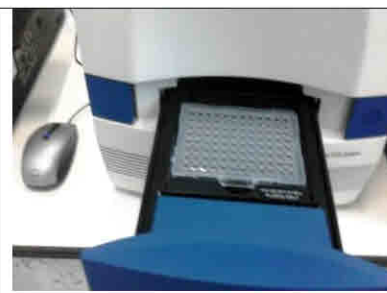


			
<p><b>Photo N° 38 :</b> Plaques optiques de 96 puits avec code barre (Ref : 4306737)</p>	<p><b>Photo N° 39 :</b> Films Optiques Adhésifs Starter Kit (Ref : 4311971)</p>	<p><b>Photo N° 40 :</b> Thermocycleur ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems) relié à un Microordinateur.</p>	

		
<p><b>Photo N° 41 :</b> Kit de BactoReal® Kit <i>Brucella</i> spp. de 100 tests, référence DVEB02113</p>	<p><b>Photo N° 42 :</b> Préparation du Master mix</p>	

		
<p><b>Photo N° 43 :</b> Extraits d'ADN maintenus dans de la glace pilée.</p>	<p><b>Photo N° 44 :</b> Prélèvement de l'ADN extrait.</p>	<p><b>Photo N° 45 :</b> Pose de l'ADN dans le puits de la plaque.</p>

		
<p><b>Photo N° 46 : Pose du Film Optique Adhésif sur la plaque optique.</b></p>	<p><b>Photo N° 47 : Plaque optique juste avant de commencer la PCR.</b></p>	<p><b>Photo N° 48 : Pose de la plaque dans la Centrifugeuse.</b></p>

		
<p><b>Photo N° 49 : Programmation des échantillons et contrôles.</b></p>	<p><b>Photo N° 50 : Programmation du profil thermique.</b></p>	<p><b>Photo N° 51 : Charge de la plaque optique dans le Thermocycleur.</b></p>

## Annexe N° 3

Tableau N° 12 : Concentration et pureté des ADN obtenus par extraction à partir des différents échantillons de lait testés

Identifiant de l'échantillon	Concentration de l'ADN total (ng/μl)	A260	A280	Ratio $DO_{260}/DO_{280}$	Ratio $DO_{260}/DO_{230}$
1	19,76	0,395	0,147	2,69	0,91
2	27,6	0,552	0,243	2,27	0,07
3	11,85	0,237	0,102	2,33	0,75
4	68,86	1,377	0,692	1,99	2,63
5	27,38	0,548	0,296	1,85	0,16
6	21,23	0,425	0,135	3,15	0,45
7	16,37	0,327	0,227	1,44	0,04
8	24,61	0,492	0,248	1,98	0,55
9	62,24	1,245	0,427	2,92	0,37
10	<b>4,861</b>	0,097	0,038	2,54	0,13
11	20,29	0,406	0,211	1,92	2,53
12	21,84	0,437	0,409	1,07	0,17
13	27,51	0,55	0,222	2,48	0,43
14	21,4	0,428	0,129	3,32	0,39
15	<b>5,216</b>	0,104	0,032	3,28	0,43
16	18,77	0,375	0,129	2,91	0,48
17	38,81	0,776	0,659	1,18	0,17
18	37,18	0,744	0,629	1,18	0,14
19	14,91	0,298	0,166	1,79	0,32
20	23,58	0,472	0,275	1,72	0,63
21	10,88	0,218	0,156	1,4	0,19
22	<b>3,121</b>	0,062	0,021	2,97	0,32
23	12,53	0,251	0,156	1,6	0,13
24	20,03	0,401	0,182	2,2	0,22
25	<b>6,372</b>	0,127	0,047	2,68	0,33
26	15,05	0,301	0,206	1,46	0,04
27	17,41	0,348	0,144	2,41	0,15
28	<b>5,156</b>	0,103	0,049	2,12	0,06

Suite de tableau n° 12

Identifiant de l'échantillon	Concentration de l'ADN total (ng/μl)	A260	A280	Ratio $DO_{260}/DO_{280}$	Ratio $DO_{260}/DO_{230}$
29	<b>4,283</b>	0,086	0,037	2,31	0,08
30	29,09	0,582	0,202	2,88	0,43
31	<b>6,665</b>	0,133	0,057	2,32	0,1
32	16,83	0,337	0,176	1,92	0,11
33	12,32	0,246	0,136	1,82	0,25
34	<b>7,935</b>	0,159	0,065	2,43	0,07
35	<b>6,419</b>	0,128	0,048	2,67	0,43
36	11,58	0,232	0,147	1,58	0,08
37	27,23	0,545	0,306	1,78	0,08
38	17,04	0,341	0,203	1,68	0,1
39	11,49	0,23	0,112	2,05	0,07
40	<b>4,425</b>	0,089	0,032	2,76	0,06
41	102	2,039	1,083	1,88	0,6
42	20,52	0,41	0,209	1,96	0,52
43	52,94	1,059	0,549	1,93	1,66
44	80,48	1,61	0,848	1,9	2,24
45	39,9	0,798	0,425	1,88	0,16
46	11,37	0,227	0,123	1,85	0,48
47	<b>6,086</b>	0,122	0,052	2,34	0,05
48	21,97	0,439	0,23	1,91	1,38
49	<b>6,754</b>	0,135	0,049	2,77	0,29
50	<b>9,008</b>	0,18	0,071	2,53	0,1
51	10,23	0,205	0,095	2,15	0,4
52	<b>5,934</b>	0,119	0,053	2,23	0,86
53	<b>5,548</b>	0,111	0,046	2,42	0,12
54	35,84	0,717	0,266	2,7	0,94
55	115,6	2,312	1,193	1,94	2,01
56	<b>4,861</b>	0,097	0,041	2,37	0,32
57	<b>5,59</b>	0,112	0,038	2,94	0,2
58	10,69	0,214	0,1	2,13	0,47



Suite de tableau N° 12

Identifiant de l'échantillon	Concentration de l'ADN total (ng/μl)	A260	A280	Ratio $DO_{260}/DO_{280}$	Ratio $DO_{260}/DO_{230}$
59	11,86	0,237	0,173	1,37	0,09
60	21,83	0,437	0,252	1,73	0,38
61	<b>4,639</b>	0,093	0,037	2,52	0,37
62	<b>4,339</b>	0,087	0,03	2,93	0,07
63	<b>7,221</b>	0,144	0,05	2,9	0,3
64	12,43	0,249	0,125	1,99	0,91
65	<b>5,837</b>	0,117	0,053	2,19	0,36
N0	5	0,1	0,033	3,02	0,22
N	4,159	0,083	0,03	2,81	0,19
N1	0,563	0,071	0,032	2,23	0,16

N0 : Contrôle négatif d'extraction

N : Contrôle négatif après répétition de l'extraction

N1 : Contrôle négatif d'extraction après ajout de l'ARNase

Les échantillons « **en gras** » sont des échantillons dont la concentration d'ADN est inférieure à 10 ng/μl malgré la répétition d'extraction.