

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

UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID-TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Laboratoire de physiopathologie et Biochimie de la Nutrition (PpaBioNut)

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE

Présenté par

Melle Ghaffour Amina

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Génétique : Gestion et Amélioration Des Ressources biologiques

Thème

Contribution à la construction d'une bibliothèque d'ADN de patients et résistants à la brucellose et conception des amorces du gène TNF alpha.

Soutenue le 03/07/2017

Président	GAOUAR Souheil	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur	BRAHAMI Nabila	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice	BRAHIMI Houria	MAA	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2016-2017

Remerciement

Je remercie en premier lieu notre Dieu « ALLAH » Le tout puissant qui nous a dotés de la merveilleuse faculté de raisonnement, de m'avoir donnée le courage et la volonté de mener à terme le présent travail.

Je remercie chaleureusement Mme BRAHAMI NABILA Maître de Conférences à l'université de Tlemcen, mon encadreur, pour l'aide qu'elle m'a fournie pendant la préparation de ce mémoire, et d'avoir collaboré avec moi.

Je tiens à remercier vivement Dr. BRAHIMI HOURIA professeur en infectiologie du C.H.U de Tlemcen, qui m'a dirigé avec une disponibilité permanente et qui a consenti tous ses efforts à l'élaboration de ce modeste travail, ses encouragements, ses précieux conseils, ses orientations, ainsi que sa gentillesse m'ont énormément aidé. Qu'elle trouve ici l'expression mon profond respect, et avoir accepté d'être membre de jury me fait un très grand honneur.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Docteur GAOUAR Samir Bachir Souheil Maître de Conférences à l'université de Tlemcen, de m'avoir assisté au laboratoire, et de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Je remercie Dr. BOUABDALLAH chef du service des maladies infectieuses du CHU de Tlemcen, pour son accueil chaleureux durant mon stage, et Mr. RAHMOUN qui m'a permis de travailler dans son laboratoire, Mme. TRIQUI Chahinaz qui a aussi collaboré à mon aide.

Dédicaces

Avec l'aide de dieu, j'ai pu réaliser ce modeste

Travail que je dédie :

A mes chers parents qui m'ont aidé à être ce que je suis, avec tant d'amour et D'affection et pour leur soutiennent durant toutes mes années d'études

A mon cher frère «Aness».

A ma chère grand-mère

A mes oncles et tous mes cousins et Cousines

A mes ami(e)s <<Sara, Ghizlen>>

À tous ceux qui par leur sourire, leur gentillesse, sans oublier bien sûr mon cher « grand père ALLAH YERAHMHOU » qui ma conseiller et encouragé à poursuivre mes études universitaire.

Résumé

Introduction : La brucellose, maladie contagieuse des animaux d'élevage, connue sous le nom de fièvre de Malte ou mélitococcie. C'est une anthroponose, due à des bactéries du genre *Brucella*. Son extension est mondiale, avec une prédominance dans le pourtour du bassin méditerranéen et les pays en voie de développement, où elle pose encore un véritable problème de santé publique, et représente un surcoût économique important. La prévention de la maladie est essentielle, compte tenu de son risque pour la santé humaine et son impact économique important.

Objectif : Construction d'une bibliothèque d'ADN par extraction d'ADN à partir du sang prélevé chez des patients atteints de la maladie de brucellose et les résistants et aussi une conception d'amorces encadrant le gène TNF alpha.

Matériels et méthodes : 21 prélèvements ont été effectués, dont 8 résistants et 13 malades, au niveau du service des maladies infectieuses du CHU de Tlemcen. L'extraction de l'ADN est réalisée grâce à la technique NaCl. Les concentrations de ces ADN ont été dosés par spectrophotométrie à 260nm et à 280 nm. Des amorces spécifiques encadrant le gène TNF alpha sont conçues par l'outil Primer –Blast.

Résultats : Un total de 13 ADN est extrait des patients, et 8 ADN des sujets résistants. Le dosage de ces ADN a montré 21 ADN contaminés spécifiquement par les protéines.

Mots clés : Brucellose, ADN, amorces, gène TNF alpha, patients, résistants, Tlemcen.

Abstract

Introduction: Brucellosis, a contagious disease of livestock, known as Maltese fever or melitococcus. It is an anthroozoonosis, due to bacteria of the genus *Brucella*. Its extension is global, with a predominance in the Mediterranean basin and the developing countries, where it still poses a real public health problem, and represents a significant economic cost. Prevention of the disease is essential, given its risk to human health and its significant economic impact.

Objective: Construction of a DNA library by DNA extraction from blood taken from patients with brucellosis disease and resistant and also a design of primers framing the TNF alpha gene.

Materials and methods: 21 samples taken, including 8 resistant and 13 patients, in the department of infectious diseases of the Tlemcen University Hospital. The extraction of the DNA is carried out using the NaCl technique. These DNAs are assayed by spectrophotometry at 260 nm and 280 nm. Specific primers surrounding the TNF alpha gene are designed by the Primer-Blast tool.

Results: A total of 13 DNA is extracted from patients, and 8 DNA from resistant subjects. The dosage of these DNAs showed 21 DNAs specifically contaminated by proteins.

Key words: Brucellosis, DNA, primers, TNF alpha gene, patients, resistant, Tlemcen.

Table des matières

Remerciement.....	II
Dédicace.....	III
Résumé	IV
Abstract	V
Table de Matières	VI
Liste des abréviations.....	IX
Liste des tableaux	XI
Liste des figures	XII
Liste des Annexes	XIII

Synthèses bibliographiques

I. Introduction Générale.....	1
I.2. Historique.....	4
I.3. Epidémiologie.....	5
I.3.1 Données épidémiologiques	5
I.3.2 Répartition géographique :.....	5
I.3.3. Agent causal :.....	9
I.3.4 Réservoir :.....	9
I.3.5. Facteurs favorisants	10
I.4 Modes de contamination	11
I.4.1 Contamination directe :.....	11
I.4.2 Contamination indirecte.....	11
II. Pathogénie.....	12
III. Etude Clinique	14
III.1 Forme septicémique aigue	14
III.1.1. Incubation.....	14
III.1.2 La primo invasion - phase d'état.....	14
III.2 Evolution.....	15
III.3 Formes cliniques.....	15
III.3.1 Formes compliquées.....	15
III.3.2 Formes chronique	16
IV. Diagnostic	18
IV.1. Diagnostic direct :	18
IV.1.1 Culture.....	18

IV.1.2 La PCR.....	19
IV.2 Diagnostic indirect.....	21
V. Etude bacterio-genetique.....	23
V.1. Génome de la bactérie Brucella.....	23
V.2 Antigènes.....	29
V.2.1 Contournement du système immunitaire par Brucella.....	31
VI. Gène TNF alpha.....	32
VI.1 Structure et biosynthèse du TNF- alpha.....	32
VI.3. Rôle du gène TNF dans la résistance à la brucella.....	36
VII. Traitement.....	37
VII.1 Traitement curatif.....	37
VIII. Prophylaxie.....	39
Partie pratique	
Matériel et méthodes	
I. Matériel et méthodes.....	40
I.1. Type de l'étude.....	40
I.2. Population et lieu de l'étude.....	40
I.3. Collecte des données.....	41
I.3.1. Questionnaire.....	41
I.3.2. Prélèvement sanguin.....	42
I.3.3. Séro-agglutination de Wright (SAW).....	43
I.3.4. Extraction de l'ADN par la technique NaCl (Salting out).....	44
I.3.5. Dosage de l'ADN.....	47
I.3.6. Conception des amorces pour la PCR.....	48
I.3.7. Gène codant TNF alpha.....	51
II. Résultats.....	54
II.1. Caractéristiques sociodémographiques.....	54
II.1.1. Répartition des cas selon l'âge.....	54
II.1.2. Répartition des cas selon le sexe.....	54
II.1.3. Répartition des cas selon la profession.....	55
II.1.4. Répartition des cas selon l'état matrimonial.....	55
II.1.5. Répartition selon le contexte épidémiologique.....	56
II.1.6. Répartition selon les symptômes cliniques.....	56

II.1.7. Répartition selon le traitement.....	57
II.1.8. Répartition des cas selon l'évolution.....	57
II.2. Caractéristiques génétiques	58
Discussion	62
Conclusion	64
Référence bibliographique	65
Annexes	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μl : microlitre

μg : 10⁻⁶ g

ABC : ATP-Binding Cassette

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

B : Bactérie du Brucella

BCSP31 : Brucella Cell Surface Protein

Brucella en phase R : Brucella en phase rugueuse (ou Rough)

Brucella en phase S : Brucella en phase lisse (ou Smooth)

C : Cytosine

CD: Cluster de différenciation

CD8+ : Cluster de différenciation 8

CNR : Centre National de Référence

DO : Densité optique

DOc : DO corrigée ou annexée

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

Fg : femtogramme : 10⁻¹⁵ g

G : Guanine

GI : Genomic Island ou îlots génomiques

GM-CSF: Granocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

IFN : Interférons

IgA : Immunoglobulines de type A

IgG : Immunoglobulines de type G

IgM : Immunoglobulines de type M

IL -1: l'interleukine- 1

IL -2: l'interleukine- 2

IS : séquences d'insertion

kb : kilobase

kDa : kilodalton

LPS : Lipopolysaccharide

LSB : lyse des globules blancs

LPS-R : LPS porté par les Brucella de forme Rough (R)

LPS-S : LPS porté par les Brucella de forme Smooth (S)

MLSA : Analyse multi-locus de séquences

NaCl : Chlorure de sodium

ng : nanogramme : 10⁻⁹ g

NIK NFκB : Inducing Kinase

JNK Jun : N-terminal Kinase

OIE : Office international des épizooties

ORF : Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert

pb : Paire de base

PCR : Polymérase chain réaction ou réaction de polymérisation en chaîne

Sp : Spécificité

Th1 : Des cytokines T helper de type 1

TNF- α : nécrose tumorale α

TNF : Tumor Necrosis Factor

LISTE DES TABLEAUX

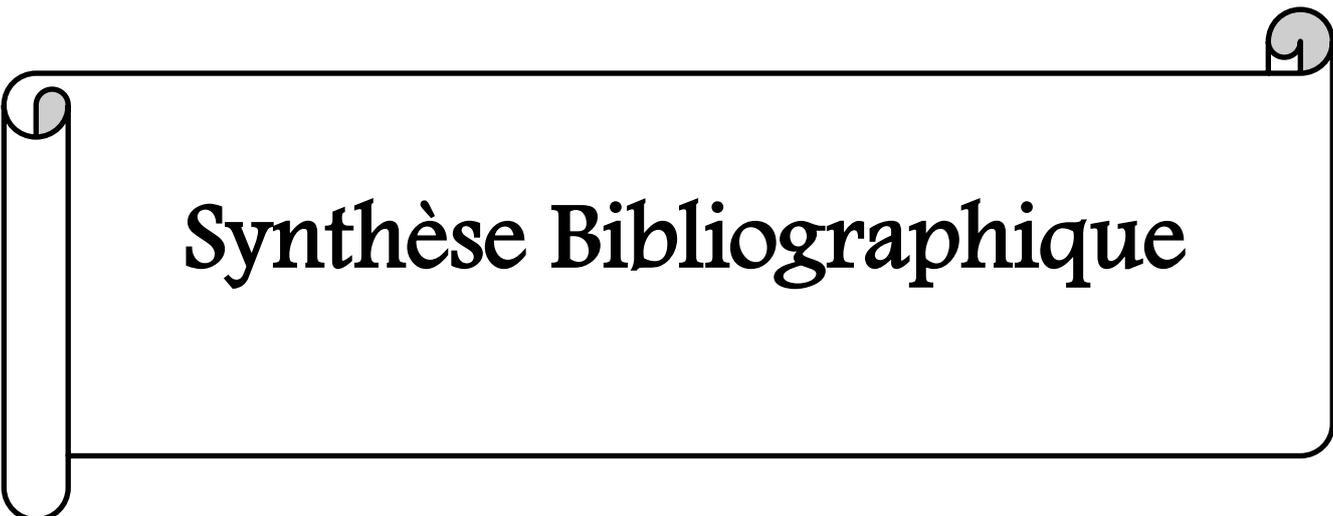
N°	Intitulés	Page
Tableau 1	Réservoir des espèces de <i>Brucella</i> et leur pathogénicité pour l'homme	10
Tableau 2	Symptômes et signes de la brucellose (> 900 observations)	16
Tableau 3	Principales techniques de diagnostic indirect et leurs caractéristiques	22
Tableau 4	Génome séquencé des espèces de <i>Brucella</i>	24
Tableau 5	Principaux antibiotiques prescrits au cours de la brucellose	38
Tableau 6	les patients étudiés	41
Tableau 7	Les résistants étudiés	42
Tableau 8	Indications pour l'évaluation du degré de pureté d'ADN	47
Tableau 9	Résultats des dosages de l'ADN extrait des patients atteint de Brucellose	59
Tableau 10	Résultats des dosages de l'ADN extrait des sujets résistants à la brucellose	60

LISTE DES FIGURES

N°	Intitulés	Page
Figure 1	Photo d'un veau atteint de Brucellose	3
Figure 2	Photo de David Bruce	4
Figure 3	Incidence mondiale de la brucellose humaine	6
Figure 4	incidences de la brucellose en Algérie	9
Figure 5	Interrelations entre l'homme et les animaux réservoirs	12
Figure 6	Représentation du trafic intracellulaire de <i>Brucella</i> dans la cellule HeLa et dans le macrophage(Michaux-Charachon et al.,2002)	13
Figure 7	Présentation classique de la maladie	17
Figure 8	La technique d'amplification PCR	20
Figure 9	Représentation de l'évolution possible de la structure génomique des différentes lignées de <i>Brucella</i> à partir d'un ancêtre commun possédant un seul chromosome	26
Figure 10	Organisation génétique de 5 Ilots Génomiques GIs (GI-1, GI-2, GI-3, GI-5 et GI-6)	28
Figure 11	Structure cristalline du TNF alpha sous sa forme native homotrimérique	33
Figure 12	Représentation schématique de la voie de sécrétion du TNF-	34
Figure 13	Représentation schématique des différentes étapes menant à la biosynthèse et au relargage du TNF alpha par les monocytes suite à une activation par le LPS.	35
Figure 14	Prélèvement sanguin au pli du coude	42
Figure 15	La centrifugeuse de laboratoire	45
Figure 16	Culot blanc	46
Figure 17	Localisation du gène <i>TNF alpha</i>	51
Figure 18	Séquence du gène <i>TNF</i> par le site Ensembl, sont représenté en noir les séquences non codante, en rouge les exons	52
Figure 19	L'outil primer blast	53
Figure 20	Répartition des cas selon l'âge	54
Figure 21	Répartition des cas selon le sexe	54
Figure 22	Répartition des cas selon la profession	55
Figure 23	Répartition des cas selon l'état matrimonial	55
Figure 24	Répartition selon le contexte épidémiologique	56
Figure 25	Répartition selon les symptômes cliniques	56
Figure 26	Répartition selon le traitement	57
Figure 27	Répartition selon l'évolution	57
Figure 28	Résultat du Primer blast	61

LISTE DES ANNEXES

N°	Intitulés	Page
Annexe 1	Questionnaires cas-témoins	41
Annexe 2	Préparation des solutions	44



Synthèse Bibliographique

I. Introduction Générale

La brucellose est une zoonose, maladie animale transmissible à l'homme, de répartition mondiale plus fréquente sur le pourtour méditerranéen est causée par l'agent pathogène *Brucella*.

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.

Brucella est une bactérie à large spectre d'hôtes. Elle est capable d'infecter des animaux aussi différents que des ruminants (en majorité), des suidés, des canidés, des équidés et des mammifères marins.

La lutte contre la brucellose animale repose sur l'utilisation d'un ou plusieurs outils : dépistage sérologique, abattage partiel ou total des effectifs infectés, vaccination dans les troupeaux.

Le choix de la stratégie de lutte se fait en fonction de la prévalence de l'infection dans le pays et des moyens dont il dispose certaines espèces de *Brucella* sont pathogènes pour l'homme : *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* et plus récemment *B. ceti* et *B. pinnipedialis*.

La brucellose humaine est fortement liée à la brucellose animale. Ainsi, la maîtrise de la brucellose animale dans nombre de pays développés a entraîné une diminution du nombre de cas humains.

Enfin, *Brucella* est classée comme pathogène potentiel du bioterrorisme (Pappas et al., 2006b). La brucellose reste une maladie pouvant entraîner des complications graves si un traitement n'est pas rapidement mis en place. Comme pour toute maladie infectieuse, la prévention (surveillance et éradication de la maladie chez le bétail) reste le meilleur moyen de lutte.

En Algérie, elle reste endémique posant un problème de santé publique aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Plusieurs cas sont enregistrés tous les ans et déclarés à l'INSP Alger.

L'immunité à médiation cellulaire reste la réponse la plus adaptée à la résistance aux bactéries pathogènes intracellulaire, à la suite de l'activation des macrophages.

Les antigènes des *Brucella* induisent majoritairement la production de cytokines orientant la réponse immunitaire vers une réponse de type T helper 1 (Th1) (Skendros *et al.*, 2013).

Les cytokines produites par les cellules Th - 1 sont des médiateurs clés tant pour la protection contre l'infection à brucellose que pour l'augmentation du niveau de l'interféron γ (IFN- γ) au cours de la brucellose humaine. En effet l'IFN- γ est un activateur physiologique des macrophages pour produire des cytokines pro-inflammatoires l'interleukine- 1 (IL -1), facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), l'interleukine- 6 (IL- 6) l'interleukine- 8 (IL- 8). (Mailles et Vaillant., 2002) et ainsi la production d'interleukine-12 (IL-12), qui déclenche la réponse immunitaire par les lymphocytes T Th1 (Skendros et Boura ., 2013).

L'objectif de notre travail est de contribuer à la construction d'une bibliothèque d'ADN de patients et résistants à la brucellose et conception des amorces spécifiques encadrant le gène TNF alpha. Afin de faire une analyse ultérieure de la séquence génomique et une comparaison entre les patients et les résistants.

I.1. Définitions

La brucellose est une maladie infectieuse. Elle est due à la contamination par des bactéries (*Brucella*), que l'on retrouve chez certains animaux (type bovin, ovin...).

C'est une anthroponose, ce qui signifie maladie transmise de l'animal à l'homme. Elle est très fréquente dans les régions méditerranéennes.

Il y a plusieurs souches selon le réservoir : chez les bovins (*brucella abortus bovis*), chez les chèvres (*brucella melitensis*) et chez les porcs (*brucella abortus suis*)

Elle peut être transmise par voie cutanée, chez les éleveurs qui sont au contact permanent avec ces animaux, et par voie digestive lorsqu'on consomme des produits artisanaux à base de laitages frais ou des fromages au lait cru.

***La brucellose animale** : malgré de rares cas d'arthrite ou d'hygroma (figure 01), est essentiellement une maladie de la reproduction se caractérisant par :

- **chez le mâle**: épидидymites, orchites, stérilité

- **chez la femelle**: atteinte de l'utérus (métrite), infection du fœtus, mort puis avortement.

L'infection mammaire (sub-clinique) est classique.



Figure 1 : Photo d'un veau atteint de Brucellose

***La brucellose humaine** : l'homme est un hôte accidentel. Elle touche surtout les professions exposées (éleveurs, vétérinaires, ...ect)

Elle est généralement asymptomatique dans 90% des cas (formes inapparentes). Cependant, la forme sudéro-algique fébrile peut survenir. Les formes septicémiques sont généralement symptomatiques.

I.2. Historique

La brucellose humaine a été clairement identifiée (entité nosologique avec la " fièvre de l'île") par les médecins militaires anglais dont AJ. Marston en 1859 sur l'île de Malte, une importante garnison anglaise y séjournant.

L'agent causal de cette fièvre a été, finalement, isolé en 1887 par David Bruce (figure 02), bactériologiste anglais stationnant à La Valette et ce, à partir de la rate de plusieurs militaires décédés. Le germe fût initialement dénommé "*Micrococcus Melitensis*". En 1897, A. Wright décrit une approche diagnostique par la mise en évidence d'agglutinines sériques (séroagglutination lente en tube).

En Algérie, la brucellose sévit depuis le début du 19^e siècle, à l'état endémo-épidémique et constitue un problème économique et de santé publique.

En effet, les premières descriptions de la maladie ont été faites par Cochez en 1895, qui soupçonna l'existence de cette maladie à Alger, puis en 1899 par Le grain dans la vallée de la Soummam (Benhabyles et al., 1992). Au début du 20^e siècle, elle fut reconnue par Brault, d'après les symptômes cliniques, puis démontrée bactériologiquement pour la première fois par Gillot (Sergent., 1908). Ainsi, elle fût révélée en premier chez l'homme.

La brucellose reste endémique posant un problème de santé publique aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Plusieurs cas sont enregistrés tous les ans et déclarés à l'INSP Alger.



Figure 2 : Photo de David Bruce

I.3. Epidémiologie

L'épidémiologie de la brucellose humaine est étroitement liée à l'infection animale. Les espèces de *Brucella* fréquemment responsables d'infections humaines sont *B. (Brucella)*, chacune des espèces est caractérisée par un nombre limité de réservoirs habituels : *melitensis* (ovins, caprins), *B. abortus* (bovins) et *B. suis* (porcins).

I.3.1 Données épidémiologiques

La brucellose a augmenté de fréquence ces dernières années. Le nombre de cas déclarés chaque année, voisin de 1000, est très inférieur au nombre réel de malades (Ghirani et al.,2010/2011).

La fréquence de la maladie est difficile à évaluer compte tenu de son polymorphisme clinique (Ghirani et al.,2010/2011).

I.3.2 Répartition géographique :

L'Organisation Mondiale de la Santé estime l'incidence mondiale de la maladie à 500.000 cas par an (Pappas et al.,2006; Russo et al.,2009). C'est une maladie qui est devenue rare dans les pays développés, grâce à une sévère politique de dépistage et d'éradication de la maladie animale, notamment par la vaccination et l'abattage des animaux infectés.

Cependant, elle demeure endémique dans la plupart des pays sous-développés notamment ceux du bassin méditerranéen, du moyen orient, d'Asie de l'ouest, d'Afrique et d'Amérique latine (Akhvlediani et al.,2006; Cekanac et al.,2010) où elle engendre des pertes économiques importantes et menace sérieusement la santé humaine (Benkirane ,2001; Roth et al.,2003).

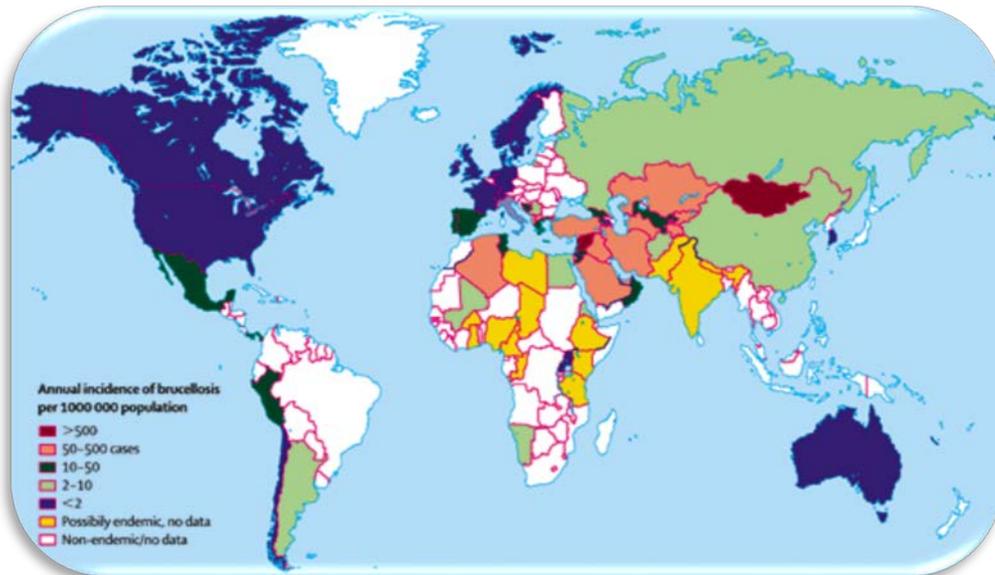


Figure 3 : Incidence mondiale de la brucellose humaine (Pappas et al.,2006)

a) Situation mondiale :

Au niveau mondial, la brucellose humaine a énormément évolué pour des raisons sanitaires, socio-économiques et politiques. Après y avoir été endémique, elle a été éradiquée dans plusieurs pays comme l’Australie, le Canada, le Japon, la Nouvelle Zélande et plusieurs pays d’Europe dont la France (figure 3). La plupart des pays d’Amérique Latine ont réussi à contrôler la maladie.

- Aux USA

Les cas de brucellose humaine ont fortement diminué depuis les années 1950 : 6321 cas déclarés en 1947, contre une incidence moyenne de 1056 cas dans la période 1993-2003. Jusqu’aux années 1960, la brucellose était principalement due à *B. abortus*, aujourd’hui elle est surtout causée par *B. melitensis*.

Dans le nord du pays, une grande partie des cas correspondent à une maladie acquise après un voyage international ou à une importation de produits alimentaires infectés venant de pays où la brucellose est endémique. Dans l’est et le sud du pays, la brucellose, attribuée à *B. melitensis*, touche essentiellement la population hispanique et la maladie est importée du Mexique par l’intermédiaire de produits laitiers infectés (Pappas et al.,2006)

- En Amérique Latine

L’agent pathogène le plus impliqué en Amérique latine est *B. abortus* avec les bovins comme principaux réservoirs naturels de *Brucella*. Le Salvador est le pays le moins atteint par

la brucellose bovine, tandis que les pays les plus touchés sont le Guatemala, le Costa Rica et le Mexique.

Au Mexique, la brucellose humaine est une des maladies d'origine bactérienne les plus sérieuses, avec 3008 cas rapportés en 2003 (Pappas et al.,2006). De plus le caractère endémique de la brucellose au Mexique a une influence sur l'épidémiologie de la maladie aux Etats-Unis. En effet, la perméabilité de la frontière entre ces deux pays est telle qu'un programme d'éradication de la brucellose aux Etats-Unis pourrait s'avérer peu efficace.

En Amérique du sud la brucellose humaine est considérée comme endémique, son incidence (cas annuelle par million de population) est de 71,55 (dont 34,9 sont représenté par le Pérou).

Ces cas sont dus à *B. melitensis* au Pérou et en Argentine et à *B. abortus* dans l'est de l'Argentine et dans les autres pays d'Amérique du sud (Pappas G.,et al.2006)

- En Afrique

Dans de nombreux pays africains les populations, souvent défavorisées, vivent auprès du bétail dont elles sont complètement dépendantes. Entre 2003 et 2004, des cas de brucellose humaine ont été recensés au Cameroun, en Ethiopie, au Kenya, au Nigeria, en Tanzanie, en Ouganda, au Burkina Faso, en République du Congo, en Erythrée, au Mali, en Namibie et au Swaziland.

De plus, des études épidémiologiques basées sur la sérologie ont montré que le Ghana, le Togo et le Tchad étaient probablement des zones de brucellose endémique(Young et al.,1989)

Par ailleurs, les modes de vie traditionnels, les maladies infectieuses endémiques beaucoup plus graves comme la malaria et les conditions économiques rendent la lutte contre la brucellose animale difficile dans certains de ces pays.

- En Europe

En Europe, le statut de « pays indemne de brucellose » est reconnu par l'Union Européenne aux pays suivants : Suède, Danemark, Finlande, Allemagne, Grande Bretagne (excepté l'Irlande du Nord), Autriche, Pays-Bas, Belgique, Suisse, Norvège et Luxembourg (Pappas et al., 2006a).

Cependant, certains de ces pays recensent quelques cas de Brucellose humaine tous les ans, ces cas étant généralement importés par des voyageurs ou des immigrants provenant de pays endémiques

L'incidence de la brucellose humaine en Europe atteint une valeur de 340,2 cas par million, dont 0,5 correspondent à la France. Cette dernière est un exemple dans l'efficacité du programme d'éradication : le pays est passé de plus de 800 cas en 1976, à 405 cas en 1983, et à 44 cas en 2000 (INVS: France. , Pappas et al.,2006)

La plupart de ces cas sont liés à la consommation de produits laitiers importés d'Espagne, du Portugal, d'Algérie ou de Turquie (Durr et al.,2003)

b) Situation en Méditerranée :

Les pays présentant l'incidence de brucellose humaine la plus élevée sont l'Algérie, l'Arabie Saoudite, l'Iran, l'Autorité Palestinienne, la Syrie, l'Egypte et l'Oman (Pappas et al.,2006; Refai .,2002)

En Algérie :

La wilaya de Sidi Bel Abbés semble la plus touchée, le marché de bétail le plus important de toute la région s'y trouve. Sur une période de 30 ans de Janvier 1980 à Décembre 2010 : 1884 cas ont été colligés (Tabet- Derraz et al.,2011)

A Oran : L'étude qui a été faite en 2000 – 2007 dans le service de maladies infectieuses de Hamam-Bouhdjar, région d'agriculture et d'élevage située à 50 km d'Oran a révélée :

-59 cas (49 %) avaient une activité professionnelle exposante ; la consommation de lait de vache est retrouvée chez tous les patients

-35 cas (29 %) sont hospitalisés au-delà de la troisième semaine d'évolution (Boualem et al.,2009)

A Tlemcen : en 2014 enregistré 97cas, 2015 le taux a augmenté à 127 cas, et en 2016 le nombre de cas annuelle déclaré était 139cas (sachant qu'il s'agit pas de vrais chiffres vu la sous déclaration de la maladie)

Les wilayas qui observent les taux régionaux les plus élevées sont les wilayas d'élevage: Tébessa (246,67), M'Sila (245 ,67), Laghouat (191,41), Khenchela(180,48), Biskra (109,47), Saïda (94,12), Naâma (79,42) et Djelfa (66,33)(Khettab et al.,2009/2010).

La figure 4 montre l'incidence de la maladie Brucellose en Algérie pendant la période allant de 1990 à 2011.

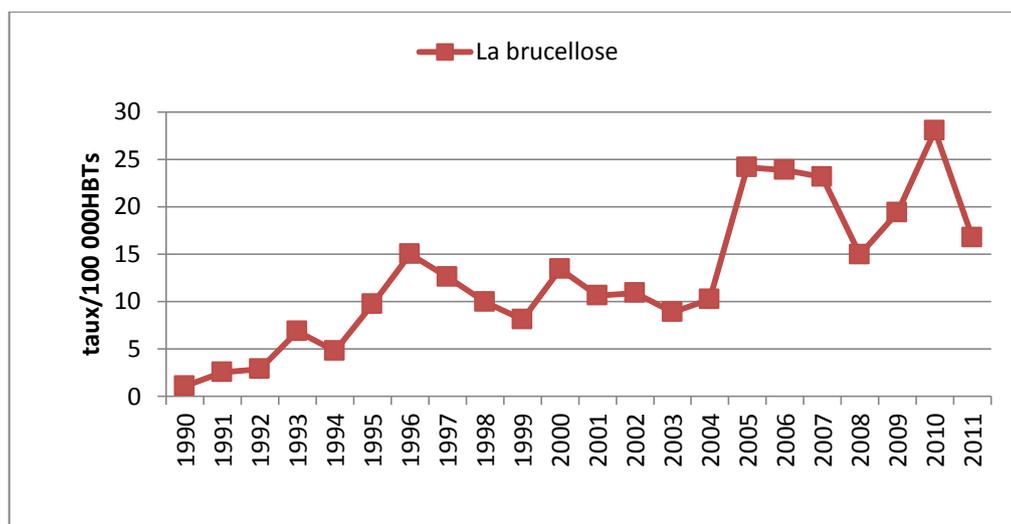


Figure 4 : incidences de la brucellose en Algérie (1990-2011)

I.3.3. Agent causal :

Brucella est un très petit coccobacille à Gram négatif de 0,5-0,7 x 0,6-1,5 pm (7,5 pm pour un globule rouge). La bactérie est immobile, non encapsulée, non sporulée et aérobic stricte.

Il en existe plusieurs espèces dont quatre sont pathogènes pour l'homme : *B. melitensis*, *B. abortus bovis*, *B. suis* et *B. canis* qui, en France, sont classées dans le groupe 3 de l'arrêté du 18 juillet 1994 (agents pathogènes pour l'homme pour lesquels existe une prophylaxie).

Son génome est habituellement composé de 2 chromosomes capables de vivre dans les macrophages et les cellules dendritiques « un pathogène intracellulaire facultatif » (Michel 2015-2016)

I.3.4 Réservoir :

Les animaux d'élevage sont les principaux réservoirs de la brucellose mais des bactéries se sont étendues à certains mammifères sauvages et marins. La pathogénicité de la bactérie varie en fonction des espèces (Tableau 1).

Tableau 1: Réservoir des espèces de *Brucella* et leur pathogénicité pour l'homme (Alton et al., 1988; Sohn et al., 2003)

Espèce	Biovars	Réservoir	Pathogénicité pour l'Homme
<i>B. melitensis</i>	1-3	Caprins, ovins, camélidés	Très forte
<i>B. abortus</i>	1-6 ; 9	Bovins, camélidés, yacks, buffles	Forte à très forte
<i>B. suis</i>	1-5	Suidés (1-3), lièvres (2), caribous et rennes (4), rongeurs sauvages (5)	Forte pour les biovars 1 et 3, modérée pour le biovar 4, faible pour le biovar 2 et inconnue pour le biovar 5
<i>B. canis</i>	-	Canidés	Faible
<i>B. ovis</i>	-	Ovins	Non pathogène
<i>B. neotomae</i>	-	Rongeurs	Inconnue
<i>B. pinnipediae</i> et <i>B. cetaceae</i>	-	Baleine, dauphins, phoques, morses	Forte pour certaines espèces, inconnue pour les autres

I.3.5. Facteurs favorisants

a) Caractéristiques des personnes

La brucellose survient à tous les âges avec une prédominance chez l'adulte jeune de sexe masculin.

En Algérie, les incidences spécifiques par tranches d'âge sont toutes supérieures à 14 cas pour 100.000 habitants à l'exception des 0-4 ans et des 30-39 ans (Khettab et al., 2009/2010).

Les professions particulièrement exposées : Toutes les personnes travaillant en présence d'animaux infectés ou leur environnement souillé (litières, locaux d'élevage, véhicules de transport...) : éleveurs et vétérinaires surtout lors d'une mise bas ou d'un avortement, bergers, laitiers, employés d'abattoirs (manipulation de carcasses ou d'abats...), équarrisseurs..., agriculteurs, personnes vivant dans les exploitations infectées, personnel de certains laboratoires (laboratoires vétérinaires).

Habitudes alimentaires : la consommation de lait cru et les mauvaises conditions d'hygiène.

b) Caractéristiques de temps

En Algérie, le maximum de cas est enregistré entre mai et septembre, correspondant à la période de mise bas du cheptel mais également à celle de la consommation maximale de lait et de ses dérivés, notamment, un fromage de chèvre particulier.

c) Caractéristiques de lieu

Ce sont surtout les wilayas d'élevage de caprins qui notifient les incidences les plus élevées notamment celles des Hauts plateaux et du sud (Khettab et al.,2009/2010).

I.4 Modes de contamination

La transmission de l'animal à l'homme se fait donc le plus souvent par contact direct avec les produits d'animaux infectés urine, lait, sang, sécrétions vaginales, placenta, produit d'avortement. La transmission indirecte par des objets contaminés par ces mêmes produits est également possible.

I.4.1 Contamination directe :

Représente 75% des cas. Elle peut s'effectuer par voie cutanée ou muqueuse (favorisée par des blessures ou des excoriations), par contact direct avec les liquides organiques et les tissus d'animaux infectés, vivants ou morts, des carcasses, des produits d'avortement, des produits souillés (litière, fumier...), ou par contact accidentel avec des prélèvements dans un laboratoire (manipulation de culture).

I.4.2 Contamination indirecte :

Représente 25% des cas, se fait par ingestion de produits laitiers non pasteurisés (lait cru ou produits laitiers infectés), ou de viande insuffisamment cuite, provenant d'animaux infectés (figure 5), ou par ingestion de crudités souillées par du fumier ou mains contaminées, ou par inhalation de la poussière de litière, dans une étable vide, ou de poussières lors de la manipulation de produits souillés, ou d'aérosol contaminé dans les laboratoires ou les abattoirs, ou par contact accidentel avec une souche vaccinale lors de la vaccination d'ovins (ou de caprins).

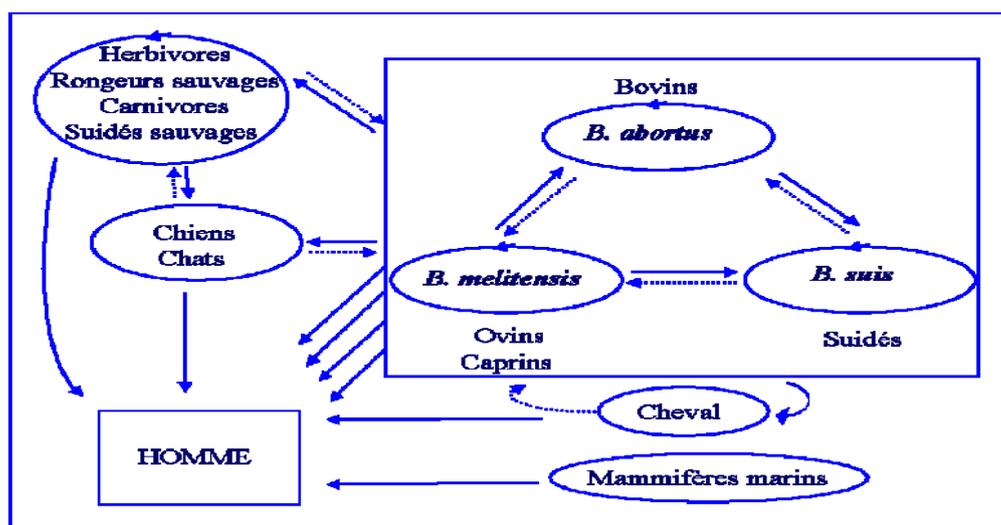


Figure 5 : Interrelations entre l'homme et les animaux réservoirs (Garin-Bastuji .,1993b)

La transmission interhumaine est exceptionnelle. Elle se fait alors par voie sexuelle et transplacentaire ou par allaitement maternel.

Une souche vaccinale lors de la vaccination d'ovins (ou de caprins).

II. Pathogénie

Les Brucella sont connues pour être des bactéries intracellulaires facultatives. La pénétration de la bactérie se fait généralement via les muqueuses orales, du nasopharynx, des conjonctives, par voie génitale et parfois, par des lésions cutanées.

Une fois parvenue dans le système lymphatique de l'hôte, les bactéries se répandent par voie sanguine ou lymphatique dans les différentes parties de l'organisme jusqu'à atteindre divers organes, pouvant causer une infection localisée au niveau du tissu atteint.

Les mécanismes moléculaires de virulence de Brucella permettent l'invasion de la bactérie, l'échappement à la lyse par les phagocytes lui procurant ainsi, une niche intracellulaire pour sa réplication (Gorvel Moreno, 2002 ;Michaux-Charachon et al., 2002).

La localisation intracellulaire de la bactérie lui permet d'échapper aux défenses immunitaires, ce qui rend la maladie persistante. Brucella a la capacité de se répliquer dans les cellules phagocytaires comme le macrophage, mais également d'être internalisée par des cellules non phagocytaires comme les fibroblastes ou les cellules HeLa (Figure 6), en utilisant

les mêmes mécanismes que ceux utilisés dans le macrophage (Dettelleux et al., 1990 ; Rabinovitch, 1995 ; Liautard et al., 1996)

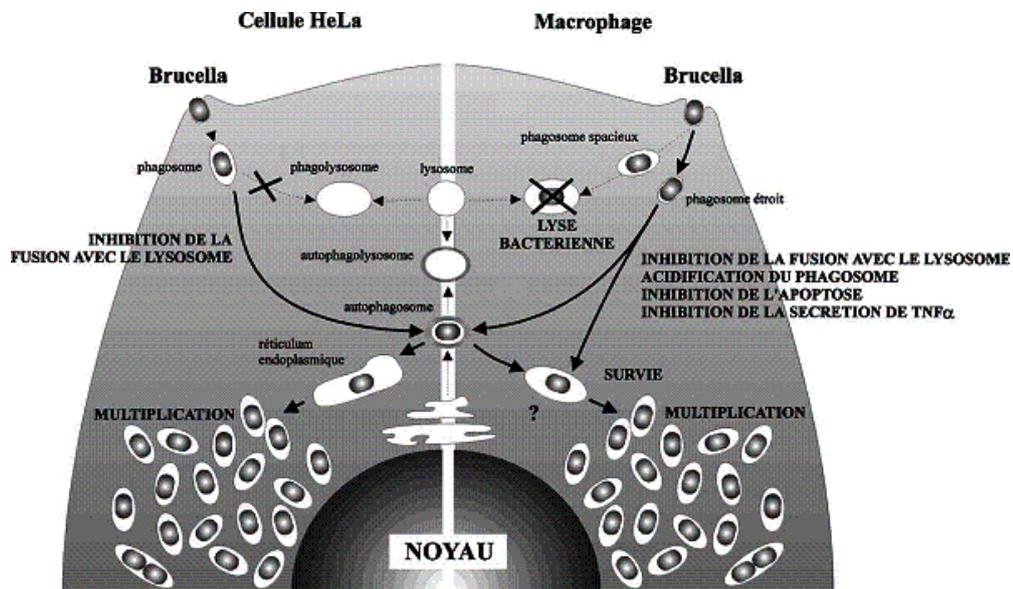


Figure 6: Représentation du trafic intracellulaire de Brucella dans la cellule HeLa et dans le macrophage (Michaux-Charachon et al., 2002)

Après son entrée dans une cellule non phagocytaire comme la cellule HeLa ou dans un macrophage (Figure 06), la bactérie est ingérée et se retrouve dans un phagosome précoce, puis dans un autophagosome où elle est capable de se multiplier après inhibition de la fusion phagolysosomiale.

Dans le macrophage, la grande majorité des Brucella sont tuées après leur entrée mais la faible proportion de bactéries retrouvées dans l'autophagosome suffit pour maintenir la survie et la multiplication de la bactérie dans le macrophage (Michaux-Charachon S., et al. 2002).

De plus, l'acidification rapide et importante (pH 4) du phagosome semble être un signal inducteur de facteurs de virulence essentiel pour la bactérie (Michaux-Charachon et al., 2002). Il a été mis en évidence qu'un système de régulation à deux composants, appelé BvrS/BvrR, et qu'un système de sécrétion de type IV étaient essentiels à la virulence de Brucella.

En effet, chez des bactéries présentant des mutations affectant le système de régulation BvrS/BvrR, il a été montré une incapacité à inhiber la fusion lysosomiale et à se multiplier dans la cellule (Sola-Landa et al.,1998).

De même, des bactéries présentant des mutations dans l'opéron codant pour les protéines du système de sécrétion de type IV, appelée « virB » sont incapables de se multiplier dans les macrophages(O'Callaghan et al.,1999). Le système de sécrétion de type IV VirB secrète des effecteurs impliqués dans la survie de la bactérie et l'inhibition du phagosome avec les lysosomes (Starr et al.,2008).

Une fois la niche intracellulaire de réplication établie, les bactéries vont tenter de se maintenir dans la cellule le plus longtemps possible en inhibant l'apoptose (Michaux-Charachon Set al.,2002)

La réponse humorale est dirigée principalement contre l'antigène majeur de Brucella, à savoir la chaîne O de son lipopolysaccharide (LPS, un composant de la membrane externe). Ces anticorps anti-LPS induisent une lyse bactérienne, par la voie classique du complément ainsi que par opsono-phagocytose (Lapaque et al, 2005).

Une réponse se développe aussi contre des protéines de la membrane extérieure, du périplasme, et du cytoplasme, mais plus tardivement. Le LPS de Brucella possède une structure (Figure 06) 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. Etude Clinique

III.1 Forme septicémique aigue

La brucellose est une maladie d'expression très polymorphe « **Maladie aux Cents visages** », de longue durée, et évoluant par poussées successives.

III.1.1. Incubation

Elle correspond à la multiplication du germe dans le premier ganglion lymphatique rencontré. Cette période peut varier de une à quatre semaines.

III.1.2 La primo invasion - phase d'état

Cette phase est aussi appelée brucellose aiguë, infection généralisée avec état septicémique ou fièvre sudéro-allergique. Elle correspond à la dissémination par voie sanguine du germe

vers d'autres ganglions lymphatiques et vers les organes du système réticulo-endothélial (foie, rate, moelle osseuse, organes génitaux...) où leur position intracellulaire dans les globules blancs les met relativement à l'abri des défenses naturelles ou artificielles.

Une fièvre ondulante est observée. La température du malade augmente par paliers de 0,5°C jusqu'à 39°C où elle se maintient pendant une quinzaine de jours pour redescendre graduellement. Chaque onde fébrile est séparée de la suivante par une période où la température se normalise pendant environ une semaine.

III.2 Evolution

Sans traitement, les ondes s'espacent de plus en plus jusqu'à leur disparition. Des sueurs abondantes sont présentes. Elles ont une odeur caractéristique de paille mouillée et sont surtout nocturnes. Il existe aussi un état de malaise avec courbatures, asthénie, douleurs mobiles.

L'examen clinique peut retrouver un gros foie (hépatomégalie, une grosse rate splénomégalie ou des adénopathies.

III.3 Formes cliniques

III.3.1 Formes compliquées

a) La brucellose focalisée secondaire et tardive

Cette phase survient 6 mois après la septicémie en l'absence de traitement ou lorsque celui-ci a été insuffisant. Ces foyers peuvent être ostéo-articulaires (75%), neurologiques, hépatiques, génitaux ou cardiaques (mortels dans 80 % des cas).

L'évolution spontanée de la brucellose se caractérise par la possibilité de survenue de localisations secondaires, ou brucellose localisée, qui fait la gravité de la maladie.

Après plusieurs mois d'évolution (6 mois), Il y a constitution de foyers infectieux isolés ou multiples localisations.

- **Ostéo-articulaires**, les plus fréquentes (75% des cas) : polyarthrites, surtout spondylodiscites et sacro-illites de diagnostic radiologique tardif, d'où l'intérêt du scanner et de l'IRM, (Tableau 2).
- **Cardiaques** : péricardite, myocardite, surtout endocardite, localisation la plus préoccupante, habituellement sur valvulopathie préalable,

- **Neurologiques** : méningite, méningo-encéphalite, arachnoïdite, myélite, atteinte des nerfs crâniens ou périphériques, abcès cérébraux ou cérébelleux, hépatite: abcès hépatiques, hépatite granulomateuse,
- **Uro-génitales** : Orchi-épididymite, salpingite, endométrite, abcès tubo-ovariens, pyélonéphrite, La mise en évidence d'un foyer nécessite la recherche d'autres foyers : échographie abdominale, échographie cardiaque, scanner (ou IRM) rachidien et cérébral.

III.3.2 Formes chronique

Elle survient parfois après les deux premières phases mais elle peut être aussi inaugurale. Les manifestations sont une asthénie persistante avec troubles du caractère, douleurs musculaires, névralgies, douleurs ostéo-articulaires, sueurs au moindre effort et fébricule. On parle de « **Patraquerie brucellienne** ». Il s'agit d'une hypersensibilité retardée aux toxines secrétées par *Brucella*.

Tableau 2 : symptômes et signes du brucellose(> 900 observations)

<http://emedecine.com>

Symptômes (S)	%	Signes	%
Fièvre	98	Hépto-splénomégalie	41 ^a
S. généraux*	94	Hépatomégalie	38
Sueurs	85	Splénomégalie	22
Frissons	79	Ostéo-articulaires	23
Arthralgies	53	Bradycardie relative	21 ^b
S. gastro-intestinaux**	51 ^a	Adénopathie	9
Céphalées	42 ^a	Neurologie/SNC****	8
Douleurs lombaires	39	Orchite-épididymite	6 ^a
Myalgies	35	Cutanés	3 ^b
Tous/dyspnée	19 ^a		
Perte pondérale	18 ^a		
S. neurologiques****	14 ^a		
Douleur testiculaire	5		

NB. *Anorexie, asthénie, fatigue, faiblesse, malaise « Patraquerie brucellienne» ; ** Douleurs abdominales, constipation, diarrhée, vomissements; *** Anxiété, confusion, dépression, insomnie; **** Paralyse, rigidité nuque, œdème papillaire; **a**, 400 observations; **b**, 530 observations.

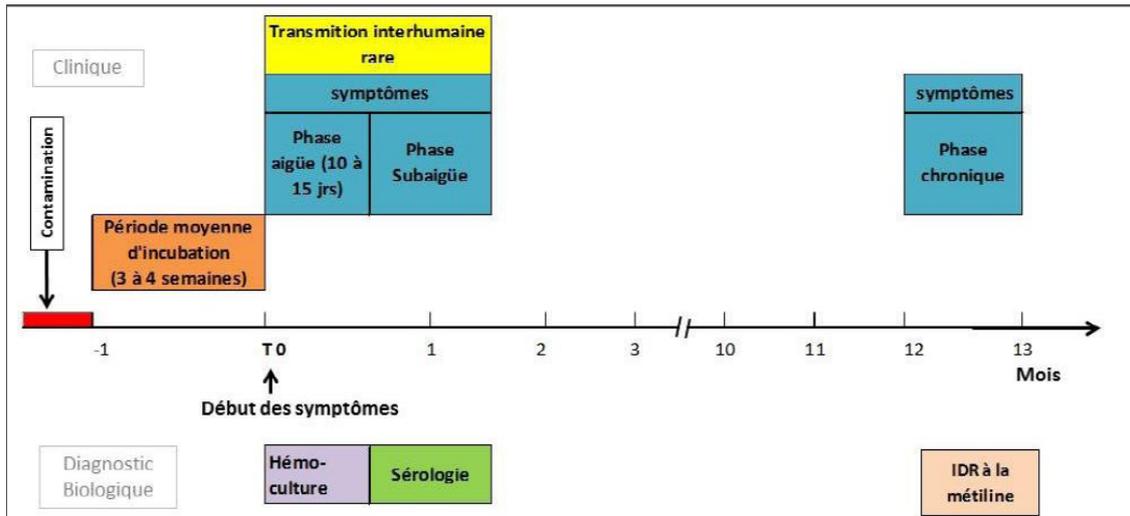


Figure 7: Présentation classique de la maladie (AVIQ agence 2016)

IV. Diagnostic

Le diagnostic de certitude de la brucellose repose sur les examens sérologiques ou sur l'isolement du germe qui dépend du stade de la maladie. Il existe deux types de diagnostic :

IV.1. Diagnostic direct :

La recherche de *Brucella* par **hémoculture ou par culture** de prélèvement dans les ganglions lymphatiques ou la moelle osseuse, du liquide céphalo-rachidien (LCR), du liquide de ponction articulaire, de foyers suppurés ou de prélèvement opératoire demeure la technique de référence pour établir un diagnostic de certitude.

IV.1.1 Culture

L'isolement des *Brucella* en culture est la technique de référence pour établir un diagnostic certain de brucellose.

Toute suspicion doit être signalée au laboratoire réalisant la mise en culture des prélèvements, en raison du risque élevé de contamination du personnel technique.

Les cultures doivent être réalisées en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (P3).

La bactérie est le plus souvent isolée à partir du sang par hémoculture. Il est indispensable que le clinicien précise l'orientation clinique, afin que les flacons insérés dans des systèmes automatisés puissent être incubés plus longtemps.

L'hémoculture est à peu près constamment positive dans la phase aiguë, et encore fréquemment dans la phase subaiguë focalisée. La recherche des germes n'est que très exceptionnellement positive dans les brucelloses chroniques.

La recherche des brucelles peut se pratiquer à partir d'autres prélèvements (ganglion, moelle osseuse, liquide céphalo-rachidien, pus de foyer...). Ces prélèvements seront ensemencés sur gélose au sang et gélose chocolat et incubés à 37 °C sous 5 à 10 % de CO₂.

La culture est lente (> 48 heures). Les colonies lisses, translucides, non hémolytiques, à bords réguliers, de coccobacilles à Gram négatif sont aérobies strictes, catalase +, oxydase + et possèdent une uréase et une nitrate-réductase (Janbon.,2000)

Le pourcentage d'hémoculture positive est élevé durant la présentation aiguë en phase septicémique. Il diminue dans les formes localisées et la culture est exceptionnellement positive durant la phase chronique. La culture devrait être réalisée dans les 15 jours qui

suivent l'apparition des symptômes cliniques. Après, sa sensibilité diminue fortement, notamment si le patient a été mis sous traitement antibiotique.

IV.1.2 La PCR

Est possible mais reste réservée à certains laboratoires, elle est particulièrement utile en cas d'antibiothérapie ayant précédé les analyses.

IV.1.2.1 Les techniques d'amplification génique

Ces techniques ne sont pas encore de pratique courante et restent réservées à certains laboratoires. La technique la plus couramment utilisée est la PCR (Maurin .,2005).

Cette technique, sensible et spécifique, est particulièrement utile en cas d'antibiothérapie préalable empêchant l'isolement de *Brucella*. La PCR permet un diagnostic plus rapide (en 24 heures) que les hémocultures, au cours de la phase aiguë septicémique, par la détection de l'ADN de *Brucella* à partir du sang ou du sérum (Maurin .,2005).

Au cours des brucelloses focalisées, la détection de l'ADN de *Brucella* à partir du pus ou de diverses biopsies est plus sensible que la culture. La plupart des tests actuellement disponibles sont spécifiques du genre et ne permettent pas de déterminer l'espèce en cause (Maurin .,2005).

IV.1.2.2 Principe de la PCR :

La PCR est basée sur le mécanisme de la réplication de l'ADN in vivo : l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et «réenroulé». Cette technique comprend les cycles répétitifs suivants (figure 8) :

- dénaturation de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire ;
- hybridation à l'ADN cible de deux oligonucléotides spécifiques utilisés comme amorces ;
- extension de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions Mg^{2+} .

IV.1.2.3 Les étapes de la PCR :

Étape 1 : Une fois tous les éléments rassemblés, l'ADN à amplifier est chauffé jusqu'à 90°C pendant 30 secondes à une minute pour séparer ses deux brins

Etape 2 : Le tube est refroidi à environ 50°C (température calculée en fonction de la séquence des amorces). Cette température va permettre l'hybridation des deux brins d'ADN avec les deux amorces.

Etape 3: Synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase.

Les trois étapes forment un cycle. La PCR se fait entre 30 et 40 cycles.

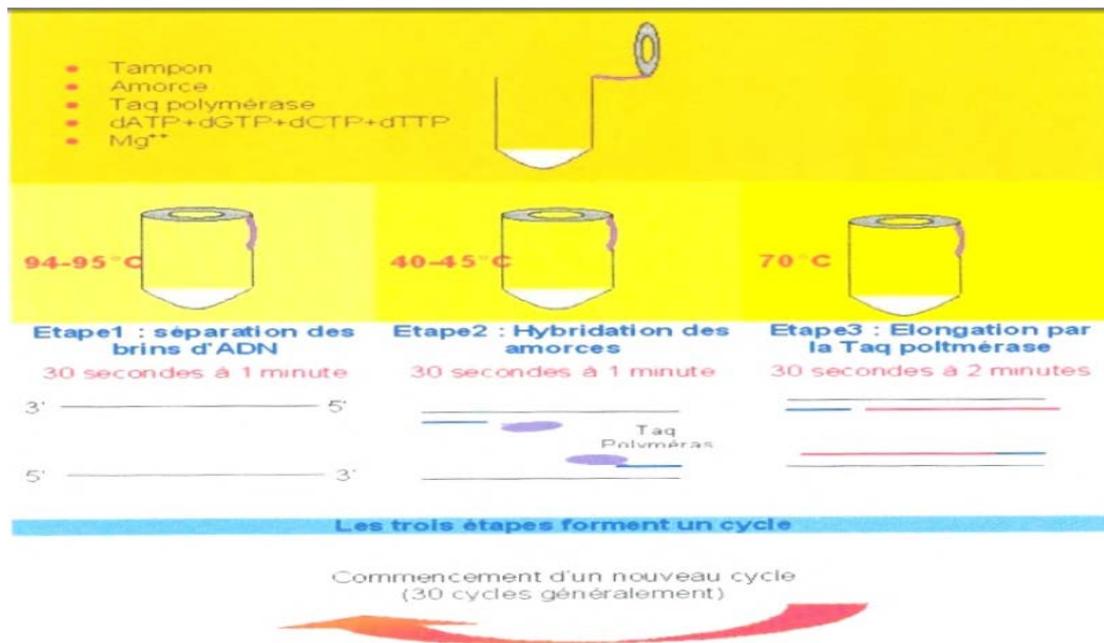


Figure 8 : La technique d'amplification PCR(Queipo-Ortuño et al.2009)

IV.2 Diagnostic indirect

Repose sur la détection ou l'augmentation du titre d'Ac spécifique (Tableau 3).

- **Sérodiagnostic de Wright (SW)** : c'est une séro-agglutination des anticorps de type IgG et IgM qui se positive 7 à 15 jours après le début des symptômes et devient rapidement négatif en cas de guérison. La persistance d'un titre élevé un an après le début doit faire suspecter un foyer profond. La SW est la réaction de référence de l'OMS.

- **Réaction à l'antigène tamponnée ou test au Rose Bengale (Card Test)** : c'est une réaction simple, rapide, sensible et spécifique d'agglutination sur lame en milieu acide utilisant une suspension de *Brucella* inactivés colorée par le Rose Bengale. Elle met en évidence les IgG et se positive plus tardivement, elle est toutefois plus sensible et reste plus longtemps positive que l'agglutination de Wright. En Belgique, le test de Rose Bengale est utilisé pour les IgM-IgG-IgA en combinaison avec le SAT et SATEDTA (IgM-IgG) et l'ELISA (IgG).

- **ELISA** : l'ELISA permet la mise en évidence d'une réaction sérologique, principalement des IgG. C'est une méthode très sensible et très spécifique qui reste positive longtemps. Le test ELISA est réalisé 2 à 4 semaines après l'apparition des symptômes. En Belgique, devant un tableau clinique caractéristique, le CNR réalise un test Elisa à deux semaines d'intervalle pour observer une possible séroconversion ou l'augmentation du titre d'Ac.

- **La réaction de fixation du complément** : peu sensible et n'est plus très souvent utilisé.

- **L'immunofluorescence indirecte** : très sensible et spécifique, permet la détection des différentes classes d'Ac (IgG, IgM, IgA).

- **L'intradermo-réaction à la mélitine** : pour les formes chroniques en recherchant une hypersensibilité retardée mais n'est plus utilisée en clinique

Tableau 3 : Principales techniques de diagnostic indirect et leurs caractéristiques(Janbon .,2000 ; Maurin .,2005)

Réactions utilisées	Classe d'anticorps mise en évidence			Sensibilité	Spécificité	Utilisation	Remarques
	IgM	IgG	IgA				
Séroagglutination de Wright (SAW)	+++	+	+	60 %	90 %	Formes aiguës et dépistage	Se négative rapidement * faux positifs (réactions croisées) * faux négatifs → recherche d'Ac bloquants
Épreuve à l'antigène tamponné au rose Bengale (EAT)	+	+++		80 %	90 %	Formes aiguës et dépistage	À faire suivre d'un SAW pour quantification si résultat positif
Fixation du complément (FC)	+	+++		60 %	95 %	Stade tardif et formes locales	Positif plus tardivement mais plus longtemps que les Ac agglutinants (SAW et EAT)
Immunofluorescence indirecte (IFI)	Toutes selon l'antiglobuline utilisée			90 %	95-100 %	Tout au long de l'évolution	Se positive tôt et le reste au moins 18 mois
Intradémoréaction à la mélitine (IDR)	Exploration de l'immunité cellulaire					Formes chroniques	* Se positive 4 semaines après le début des signes cliniques * Distinction parfois difficile entre brucellose chronique et brucellose guérie

V. Etude Bacterio-Genetique

V.1. Génome de la bactérie *Brucella*

Le génome des *Brucella* suivantes a été entièrement séquencé : *B. melitensis*16M, *B. abortus*9-941, *B. abortus*S2308, la souche vaccinale *B. abortus*S19, *B. suis* 1330 et *B. microti*CCM4915 (Tableau 4).

Quatre autres génomes de *Brucella* sont également accessibles sur GenBank : *B. melitensis*biovar 2, *B. suis* biovar 2, *B. ovis*63/290 et *B. canis*RM6/66. Chaque cellule contiendrait environ 5 fg (fg = femto gramme, 10⁻¹⁵ g) d'ADN(Queipo-Ortuño MI et al.,2005), la présence de plasmide n'a jamais été décrite.

Tableau 4: Génome séquencé des espèces de Brucella (Queipo-Ortuño et al., 2005)

Espèces	Taille des chromosomes	Numéro accession	Référence
B. melitensis 16M	1,17 Mpb 2,11 Mpb	AE008917 AE008917	Michaux et al., 1993 DelVecchio et al., 2002 Paulsen et al., 2002
B. melitensis biovar 2	1,18 Mpb 2,12 Mpb	CP001489 CP001488	GeneBank
B. abortus 9-941	2,12 Mpb 1,16 Mpb	AE017223 AE017224	Halling et al., 2005
B. abortus S2308	1,15 Mpb 2,12 Mpb	AM040264 AM040265	Chain et al., 2005
B. abortus S19	1,16 Mpb 2,12 Mpb	CP000888 CP000887	Crasta et al., 2008
B. suis 1330 Mpb	2,10 Mpb 1,20	AE014292 AE014291	Paulsen et al., 2002
B. suis biovar 2	1,40 Mpb 1,92 Mpb	CP000912 CP000911	GeneBank
B. ovis 63/290 Mpb	1,18 Mpb 2,11	CP000709 CP000708	GeneBank
B. canis RM6/66 Mpb	1,20 Mpb 2,10	CP000873 CP000872	GeneBank
B. microti CCM 4915	1,22 Mpb 2,12 Mpb	CP001579 CP001578	Audic et al., 2009

L'organisation chromosomique des espèces *B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae* et *B. suis* biovar 1 présente une forte similarité avec celle de *B. melitensis* (Paulsen et al. 2002 ; Jumas-Bilak et al.,1998). On remarque que les espèces de *Brucella* possèdent la même organisation génomique à deux chromosomes à l'exception de *B. suis* biovar 3 qui ne possède qu'un seul chromosome de 3,1 Mpb. Tous ces éléments ont permis de proposer un schéma d'évolution (Figure 9), présentant l'espèce *B. suis* biovar 3 à un chromosome comme très proche de l'ancêtre commun des *Brucella*(Jumas-Bilak et al.,1998)

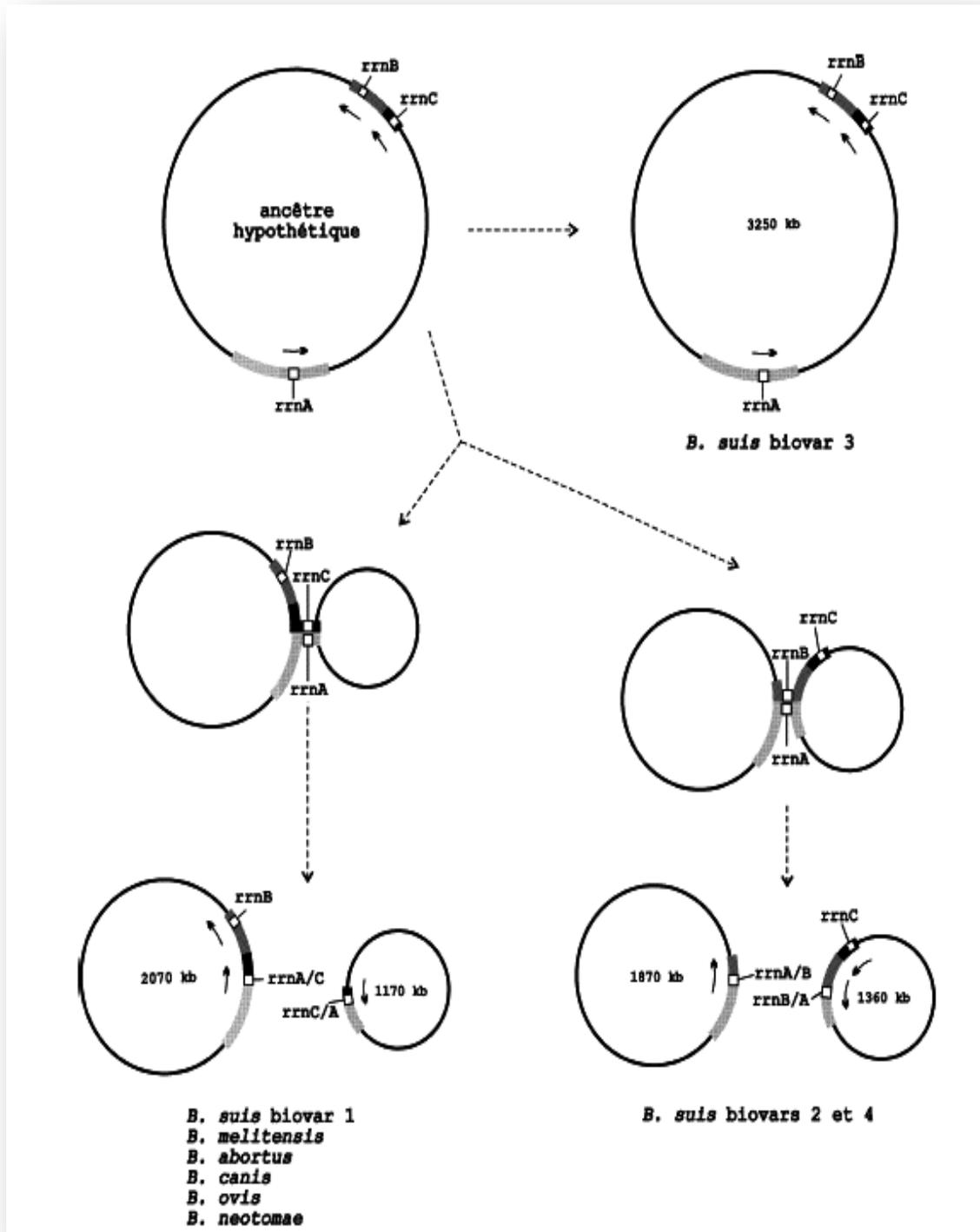


Figure 9: Représentation de l'évolution possible de la structure génomique des différentes lignées de *Brucella* à partir d'un ancêtre commun possédant un seul chromosome (Jumas-Bilak et al., 1998)

L'origine de réplication du chromosome II est typique des chromosomes bactériens, alors que l'origine de réplication du chromosome I est de type plasmidique. Malgré cela, on parle de deux chromosomes indépendants car ils contiennent des gènes essentiels à la survie et à la physiologie de la bactérie (Michaux-Charachon et al., 1993 ; Michaux-Charachon et al., 1997). De plus, le pourcentage en guanosine et cytosine (% GC) est quasiment identique pour les deux chromosomes.

La diversité génomique des espèces de *Brucella* est limitée mais suffisante pour induire la spécificité d'hôte ainsi que des différences phénotypiques. En effet, contrairement à *B. ovis* et à *B. neotomae*, *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* sont pathogènes pour l'homme, alors que pour *B. canis* les infections humaines restent rares.

De plus, les séquences génomiques des espèces *B. microti* et *B. suis* présentent 99,8 % d'identité sur les régions alignées malgré les différences de virulence et métaboliques constatées (Audic S et al., 2009).

Des analyses génomiques réalisées sur les espèces *B. suis* et *B. melitensis* montrent que certains gènes sont uniques pour chaque espèce, et qu'ils sont essentiellement liés à des îlots génomiques (GI pour Genomic Island) (Paulsen et al., 2002).

En 2004, Rajashekara et coll. (Rajashekara G et al., 2004) ont comparés les génomes de cinq espèces différentes de *Brucella* (*B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* et *B. neotomae*) à celui de *B. melitensis* 16M, choisie comme référence pour sa forte pathogénicité pour l'homme.

Après analyses par microarray et confirmation par PCR, les résultats ont mis en évidence la présence de 9 GIs. Ces études ont montré que ces îlots étaient spécifiques d'une ou de plusieurs espèces de *Brucella*.

Par exemple, 84 ORFs (Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert) retrouvés sur 5 GIs présents chez *B. melitensis* sont absents chez *B. ovis* Réo198 (Rajashekara G., Glasner JD. et al.) [59]. Ces GIs ont une taille qui varie de 4,4 kb (GI-7) à 44,1 kb (GI-5) et présentent entre 4 ORFs (GI-9) et 42 ORFs (GI-5) codant principalement pour des protéines hypothétiques, des régulateurs de transcription, des transposases ou des intégrases.

Il a également été constaté que les GIs observés chez *B. melitensis* 16M présentaient un pourcentage en GC différent du reste du génome de *Brucella* spp., suggérant une acquisition par transfert horizontal. Deux de ces îlots, un de 15,1 kb (GI-2) et un autre de 44,1 kb (GI-5)

présentent des caractéristiques des îlots de pathogénicité et sont flanqués aux extrémités par des séquences d'insertions (IS) et des gènes ARNt (Rajashekara et al., 2005) (Figure 10).

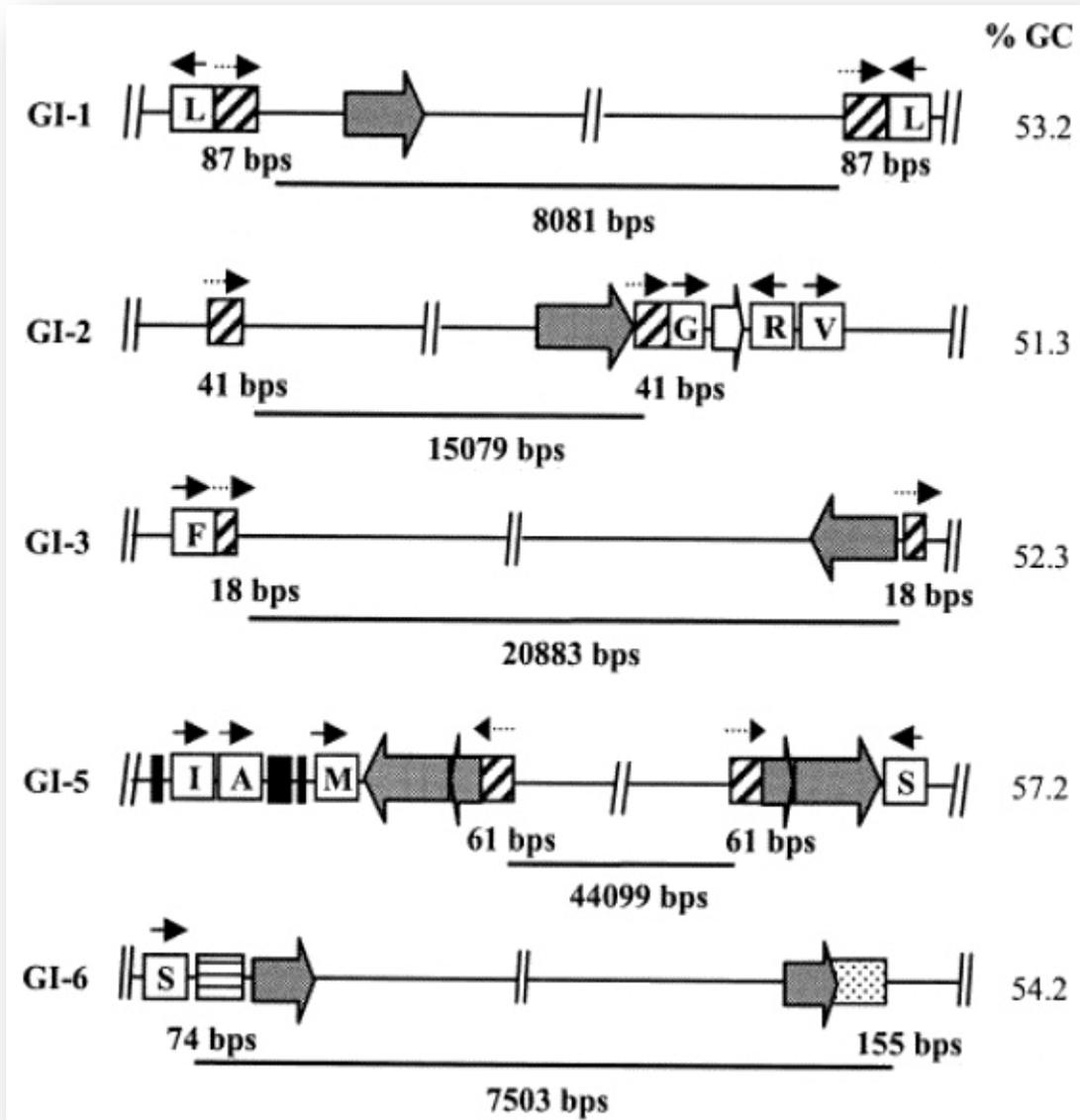


Figure 10: Organisation génétique de 5 îlots Génomiques GIs (GI-1, GI-2, GI-3, GI-5 et GI-6) (Rajashekara et al., 2004).

Les gènes ARNt associés avec les GIs sont représentés par des cases blanches avec une lettre indiquant l'acide aminé codé, leur orientation de transcription est indiquée par une flèche pleine au-dessus de la boîte.

Les boîtes noires indiquent les gènes ARNr. La ligne continue en dessous de chaque GI indique la taille de la séquence. Les ORFs codant des intégrases et les IS retrouvés aux extrémités des GI sont indiqués par des flèches gris clair. Le contenu en GC de chaque GI est indiqué sur la droite.

L'îlot GI-2 de 15,1 kb comporte 20 ORFs codant pour des protéines hypothétiques, une transposase et une intégrase et 2 ORFs impliqués dans la biosynthèse du LPS (Vizcaíno et al., 2004), et l'îlot GI-5 de 44,1 kb possède des ORFs qui codent pour des protéines de type ABC (*ATP-Binding Cassette*) :

ces transporteurs importent ou exportent une grande variété de substrats en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (Mourez et al., 2000) dont les protéines homologues présentes chez d'autres bactéries comme *Agrobacterium tumefaciens* sont importantes pour la survie intracellulaire, l'interaction avec la cellule hôte et la virulence (Rajashekara et al., 2006).

Cependant, Rajashekara et collaborateurs ont montré que la délétion de GI-5 n'avait pas d'effet sur la virulence, alors qu'une délétion de GI-2 chez *B. melitensis* 16M entraînait une atténuation de sa croissance dans les macrophages, une baisse de virulence dans le modèle murins et une apparition de phénotype rugueux (Rajashekara et al., 2008).

On constate donc une variation des îlots génomiques entre les espèces de *Brucella*. Les îlots absents chez *B. ovis* sont présents chez les *Brucella* pathogènes pour l'homme et suggèrent leur implication dans la pathogénicité. Cependant, *B. neotomae* possède ces îlots alors qu'elle ne semble pas pathogène pour l'homme.

Les différences génétiques constatées entre les *Brucella* pourraient donc expliquer la différence de spécificité d'hôte et les différences de pathogénicité (Michaux-Charachon tardive et al., 2002 ; Rajashekara et al., 2004).

V.2 Antigènes

Plusieurs composants antigéniques ont été caractérisés chez *Brucella*, dont certaines protéines membranaires, périplasmiques ou cytoplasmiques, mais l'immunogénicité du LPS est de loin la plus importante (Freer et al., 1995 ; Ko et Splitter., 2003 ; Michaux-Charachon et al., 2002)

Le LPS est caractérisé par une variation de phase, à l'origine des phénotypes lisses (S-LPS) et rugueux (R-LPS). Le LPS de toutes les *Brucella* en phase S possède des antigènes A et M inégalement répartis selon les espèces. L'antigène A domine chez *B. abortus*, l'antigène M chez *B. melitensis* et existe en proportion égale chez *B. suis*. Ceci explique pourquoi les

Brucella en phase S agglutinent toutes avec un sérum anti-*Brucella* obtenu à partir de *B. melitensis*, *B. abortus* ou *B. suis*. Les *Brucella* en phase R, *B. canis* et *B. ovis* n'ont pas d'antigène A et M mais possèdent l'antigène R. Des sérums anti-R permettent l'agglutination de ces espèces.

Les chaînes latérales polysaccharidiques (chaîne O) du LPS-S sont constituées d'un homopolymère comprenant environ cent résidus de 4-formamido-4,6-didéoxy-mannopyranosyl, support essentiel des réactions croisées entre *Brucella* spp. et *Yersinia enterocolitica*O:9, ou plus accessoirement *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*O:1, *Escherichia hermannii*, *E. coli* O:157, et *Salmonella* O:30(Corbel, 1997)

Des antigènes alternatifs ont été évalués et représentent des candidats sérieux pour le diagnostic de la brucellose ou l'élaboration de vaccins. Parmi ces antigènes, on retrouve les protéines cytoplasmiques p17, p15, et p39(Letesson et al., 1997), la protéine périplasmique BP26(Cloekaert et al., 2001b ; Seco-Mediavilla et al., 2003), les protéines ribosomales L7/L12(Bachrach et al., 1994), et une protéine cytoplasmique de 18 kDa(Gold Baum et al., 1993).

Cependant, aucun de ces antigènes n'égale l'immunogénicité dominante du LPS, cible des tests diagnostics classiques qui présentent donc toujours de meilleures performances pour le moment.

Toutefois, le manque de spécificité des tests basés sur le LPS pousse depuis longtemps les chercheurs à mettre en place un test alternatif basé sur un autre antigène ayant la capacité de garder les mêmes propriétés de sensibilité tout en ayant une meilleure spécificité.

Récemment, Kumar et collaborateurs ont produit des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine périplasmique BP26 pour la détection de *Brucella* spp.(Kumar et al., 2007). Ces anticorps ne présentent pas de réactions croisées avec *Y. enterocolitica*O: 9, *V. cholerae*, *S. Typhimurium*, et *E. coli* O157.

Les auteurs ont également développé un test de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) basé sur la protéine BP26 recombinante pour une détection indirecte de *Brucella* spp. et présentent leurs résultats comme hautement sensibles et spécifiques(Kumar et al., 2008).

V.2.1 Contournement du système immunitaire par Brucella

Comme la plupart des pathogènes, les bactéries du genre *Brucella* ont mis en place un vaste panel de stratégies leur permettant de détourner la réponse immunitaire à leur avantage et donc de survivre chez leur hôte.

a) La réponse adaptative à médiation humorale

Lorsqu'un bovin est infecté par *Brucella abortus*, la réponse humorale se met en place, déclenchant la production précoce d'IgM. Cette synthèse dépend de la voie de contamination, de la quantité de bactéries infectantes et de l'état de santé de l'individu.

La production d'IgG se met ensuite en place, suivie de la production d'IgA (Skendros et al., 2013). La réponse anticorps se fait principalement contre le LPS des *Brucella* par production d'IgG3 et IgG2a spécifiques. Du point de vue de l'infection, ces anticorps ne sont pas protecteurs et sont uniquement utilisés à des fins diagnostiques.

b) La réponse adaptative à médiation cellulaire

L'IFN γ et l'IL-12 sont deux cytokines majeures de la réponse à médiation cellulaire.

Elles sont notamment sécrétées par les LTh1, permettant l'activation des LT CD8+ cytotoxiques qui sécréteront à leur tour de l'IFN γ et iront détruire les cellules infectées.

Les antigènes des *Brucella* induisent majoritairement la production de cytokines orientant la réponse immunitaire vers une réponse de type T helper 1 (Th1), ce qui est cohérent avec leur mode de vie intracellulaire. Malheureusement, les *Brucella* sont capables d'inhiber la réponse des lymphocytes T CD8+ grâce à une protéine.

VI. Gène TNF alpha

Le facteur de nécrose tumorale est une substance produite par le système immunitaire qui intervient principalement dans la lutte contre les cellules cancéreuses. Il existe deux types de facteurs de nécrose tumorale (ou TNF, de l'anglais Tumor Necrosis Factor) : le TNF α (alpha) et le TNF β (bêta).

Ils sont produits respectivement par les monocytes activés et par les lymphocytes T, des cellules essentielles dans le système de défense immunitaire. Les deux facteurs de nécrose tumorale vont être en mesure de détruire les tumeurs en entraînant leur nécrose. Ils interviennent également dans la phase inflammatoire en cas d'infection d'où l'utilisation d'anti-TNF destinés à soulager les inflammations (Pirrick et al. 2014)

VI.1 Structure et biosynthèse du TNF- alpha

VI.1.1 Structure du TNF.

Le TNF- a été identifié dans un premier temps comme une protéine sécrétée de 17kDa mais par la suite les recherches ont montré que cette protéine existe sous une forme transmembranaire de 26kDa dans sa forme non clivée. Le TNF- humain est donc synthétisé sous la forme d'un précurseur de 26 kDa contenant 233 acides aminés. La forme de TNF- sécrétée résulte du clivage du pro-TNF- entre l'alanine 76 et la valine 77 par une métalloprotéinase, l'enzyme de conversion du TNF- (TACE).

L'action de la TACE donne ainsi naissance à une protéine sécrétée de 17kDa contenant 157 acides aminés. L'activité de cette enzyme joue un rôle important dans la régulation de l'expression de cette cytokine.

Le TNF- est une protéine non glycosylée, peu hydrophobe qui possède un point isoélectrique compris entre 4.7 et 5.3, il est biologiquement actif sous forme trimérique (**Figure 11**).

Le TNF- sous sa forme native est un homotrimère d'une masse moléculaire de 52kDa (Fiers.,1991) (**Figure 11**). Chaque sous-unité est composée de deux feuillets antiparallèles. Ces Sous-unités sont reliées de manière « tête-bêche ». Le feuillet accessible (partie externe) est riche en résidus hydrophiles alors que le feuillet interne est lui hydrophobe et contient le segment C-terminal localisé à proximité de l'axe central du trimère (Wajant et al.,2003). Les acides aminés impliqués dans la fixation aux récepteurs se situent des deux côtés de chaque « crevasse » présente entre les sous-unités. Cette structure suggère que le TNF- fonctionne par fixation de 3 molécules réceptrices (Fiers.,1991).

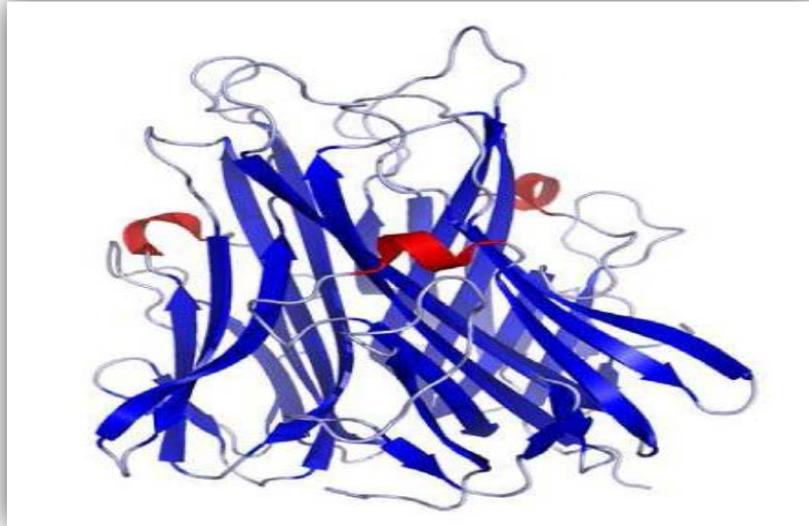


Figure 11 : Structure cristalline du TNF alpha sous sa forme native homotrimérique
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3b/TNFa_Crystal_Structure.rsh.png.

Il a été démontré que ces trimères sont déjà assemblés lors du transport du TNF alpha à la surface cellulaire (Stow et al., 2006.) (**Figure 12**). Ce trimère soluble tend à se dissocier à des concentrations inférieures au nano molaire, perdant alors son activité biologique (Wajant et al., 2003). Le TNF- est transporté jusqu'à la surface membranaire (**Figure 12**) où il peut être clivé par l'enzyme de conversion du TNF- (TACE) pour être libéré sous sa forme soluble.

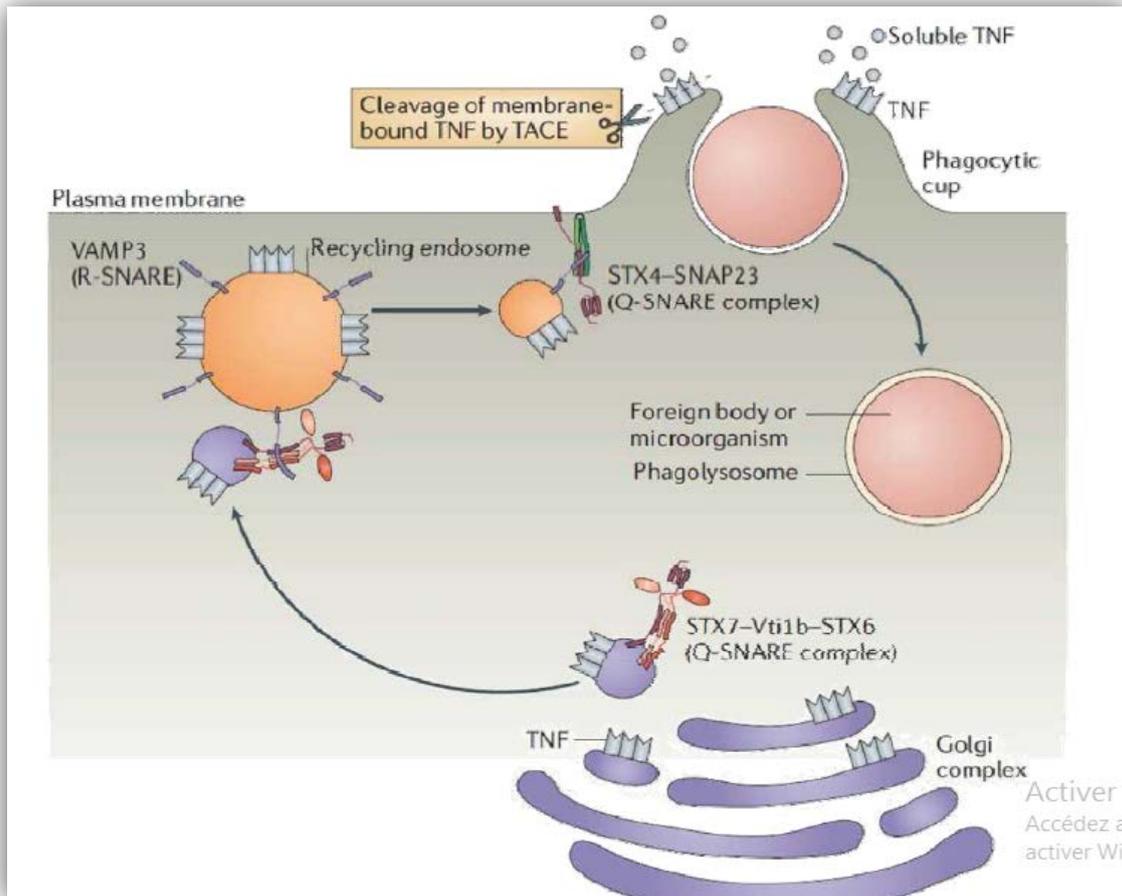


Figure 12: Représentation schématique de la voie de sécrétion du TNF- (Stow et al.,2006).
(Passage du TNF- du réticulum endoplasmique à la surface membranaire)

Le TNF- est transporté jusqu'à la surface membranaire où il peut être clivé par l'enzyme de conversion du TNF- (TACE) pour être libéré sous sa forme soluble.

VI.1. 2 Biosynthèse du TNF alpha

Le TNF- est principalement produit par les macrophages mais également par un large spectre de types cellulaires tels que les cellules lymphoïdes, les fibroblastes ou les cellules du tissu neuronal.

De grandes quantités de TNF sont produites en réponse à la stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) (**Figure 13**) ou par d'autres produits bactériens comme l'enterotoxine B. La biosynthèse de TNF est également modulée par les médiateurs de l'inflammation, notamment l'IL-1 et l'IL-2, le TNF- lui-même, le GM-CSF, M-CSF ainsi que de nombreux autres médiateurs (Akira ,Wajant et al.,2003).

L'induction de l'expression du TNF- par le LPS est très puissante et a fait l'objet de nombreuses études. Il a ainsi été possible d'identifier et de décrire le complexe de reconnaissance au LPS. Le récepteur impliqué dans cette transduction de signal est le Toll-like Receptor 4 (TLR4), un membre de la grande famille des récepteurs TLRs (Dauphinee et al., 2006, Li, Tupper et al., 2003), qui sont impliqués dans l'immunité innée.

Le récepteur TLR4 reconnaît un complexe LPS-LBP-CD14 qui va ensuite activer les voies de signalisation intracellulaires menant à la biosynthèse de TNF (Miyake 2004; Zhande et al., 2007)

Les voies NF κ B et MAPK vont mener à l'activation à la transcription du gène du TNF.

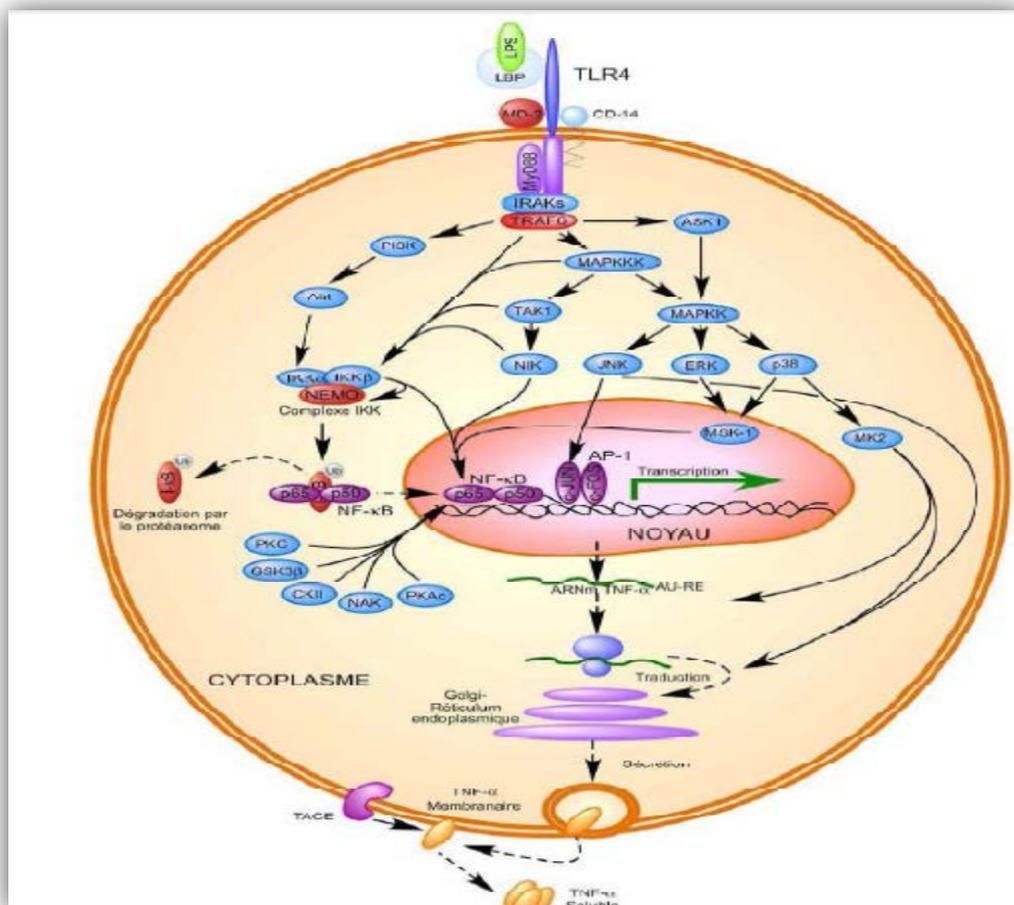


Figure 13 : Représentation schématique des différentes étapes menant à la biosynthèse et au relargage du TNF alpha par les monocytes suite à une activation par le LPS (Pinna., 2003)

VI.3. Rôle du gène TNF dans la résistance à la brucella

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-a) est une cytokine, produite principalement par des macrophages, Qui jouent un rôle important dans la résistance à l'infection par des bactéries intracellulaires.

Résistance aux pathogènes bactériens facultatifs tels que *Brucella abortus* dépend de la résistance à la médiation cellulaire acquise, Caractérisé par l'activation des lymphocytes T et par la suite l'activation des macrophages pour une destruction accru de tels organismes.

D'après des études faites, ils ont utilisés des anticorps neutralisants contre le TNF-a, pour explorer le Rôle du TNF-a endogène dans la résistance à l'Infection au brucella, en particulier l'influence de l'appauvrissement du TNF-a.

Au début de l'infection lors de l'activation ultérieure d'une réponse Th1 produisant l'IFN-g. Les mécanismes possibles par lequel TNF-a est impliqué dans la résistance sont discutés.

Il a été démontré Que TNF-a n'affecte pas la production d'IFN-g, mais il est requis pour la production d'IFN-g par Cellules NK in vitro, ainsi pour l'afflux de Phagocytes sur le site d'infection pour la formation de granulomes, et pour l'activation des macrophages. Cela indique que le TNF-a agit comme un double effet, contribuant à la fois à l'immunité et à l'immunopathologie (yifan et al.,1996).

VII. Traitement

VII.1 Traitement curatif

Le traitement curatif de la brucellose repose essentiellement sur l'antibiothérapie.

***Son but** est de traiter la maladie et d'éviter la survenue de complications et de rechutes.

***Sensibilité aux antibiotiques**

Les antibiotiques sont utilisés pour traiter la brucellose. Il est important de mettre en place un traitement rapide pour éviter une infection chronique.

Comme la *Brucella* est une bactérie intracellulaire, il faut utiliser des antibiotiques à la fois actifs sur la bactérie et pénétrant dans les cellules.

Antibiogramme limité à quelques antibiotiques, attention à la contamination de laboratoire.

Les *Brucella* sont sensibles in vitro à de nombreux antibiotiques dont les bêtalactamines mais on aura à l'esprit qu'il s'agit de parasites intracellulaires facultatifs.

In vivo, le traitement antibiotique est actif dans les formes aiguë et subaiguë ou focalisée après un temps de traitement suffisamment long pour les associations suivantes:

Tétracycline + streptomycine, doxycycline + rifampicine et, à un moindre degré, triméthoprime-sulfaméthoxazole.

L'OMS recommande rifampicine 600mg/j et doxycycline 200mg/j.

***Indications**

Les brucellas sont des germes intracellulaires, nécessitant un traitement antibiotique associant deux antibiotiques.

Suivant la période clinique :

- **Brucellose aiguë:** rifampicine 600 à 900 mg/j + doxycycline 200 mg/j, pendant 6 semaines ou rifampicine 600 mg/j + Fluoroquinolones 400 mg/j, pendant 6 semaines

- **Brucellose et grossesse:** Amoxicilline + rifampicine chez la femme enceinte,

- **Brucellose chez l'enfant:** cotrimoxazole + gentamicine chez l'enfant de moins de 8 ans.

- **Brucellose focalisée:** mêmes antibiotiques, mais la durée du traitement est prolongée (2 à 3 mois minimum à plus de 6 mois),

- **Brucellose afocale:** pas d'antibiothérapie, traitement symptomatique.

Pour la brucellose chronique, l'antibiothérapie est inutile car la bactérie est devenue inaccessible. On réalise un traitement symptomatique de l'asthénie, des douleurs et

éventuellement une désensibilisation par antigénothérapie et une exérèse des foyers infectieux.

La mise en place précoce du traitement antibiotique permet de faire disparaître rapidement la fièvre ondulante de la phase aiguë et aussi de diminuer la fréquence des atteintes viscérales et ostéo-articulaires. Il existe cependant 3 à 4 % de rechutes après traitement

Désensibilisation dans la forme chronique, difficile à obtenir en raison de l'approvisionnement difficile en allergène.

Tableau 5: Principaux antibiotiques prescrits au cours de la brucellose(Chakroun et al .,1995)

Familles	Molécules	Posologies adulte et voies d'administration	Effets Indésirables	Précautions d'emploi
Cyclines	Oxytétracycline	35 mg/kg/j PO	Photosensibilité	Contre indication : femme enceinte et enfant < 8 ans
	Doxycycline	200 mg/j PO		
Aminosides	Streptomycine	1 g/j IM	Néphro et ototoxicité	Adaptation de la posologie en cas d'insuffisance rénale
	Gentamicine	5 mg/kg/j IM		
Rifamycines	Rifampicine	15 mg/kg/j PO	Coloration rouge des urines Manifestations immuno- allergiques (prise discontinue)	
Sulfamides	Triméthoprime Sulfaméthoxazole	8 mg/kg/j 40 mg/kg/j PO	Leucopénie, anémie Allergie	Surveillance NFS Contre indication : femme enceinte
Fluoroquinolones	Ofloxacin Ciprofloxacine	400 mg/j 1,5 g/j	Photosensibilité Tendinopathie	

VIII. Prophylaxie

Elle repose sur des mesures animales et humaines. La lutte contre la brucellose animale comporte certaines mesures telles que la surveillance sérologique des animaux d'élevage, l'abattage des animaux infectés et la vaccination des jeunes animaux.

Les mesures humaines reposent sur la déclaration obligatoire de la maladie, l'hygiène des manipulations (port de gants, lavage des mains), l'éducation sanitaire et la consommation de produits laitiers pasteurisés (Bouzouaïa ., Chakroun et al.,1995 ; Janbon ,2005 ; Maurin .,2000). La vaccination des personnes exposées par fraction PI est actuellement abandonnée.



Matériels et Méthodes

I. Matériels et Méthodes

I.1. Type de l'étude

Il s'agit d'une étude descriptive prospective, réalisée au niveau du service des maladies infectieuses, durant la période allant du 1^{er} mars au 31 mai 2017.

I.2. Population et lieu de l'étude

Ce travail est réalisé au niveau du service des maladies infectieuses, CHU de Tlemcen. Après avoir remplir le questionnaire (Annexe 01), auprès des malades hospitalisés et atteints de brucellose, ainsi, les prélèvements sanguins sont effectués, après un consentement éclairé des patients.

D'autre part, l'investigateur principal (la biologiste Ghaffour) en collaboration avec le médecin infectiologue (Dr Brahimi), sont allées compléter l'enquête chez l'entourage des malades et prendre des prélèvements sanguins des personnes témoins.

Les prélèvements sanguins sont acheminés ensuite vers le laboratoire universitaire.

L'étude que nous avons entreprise, est de type Cas/Témoins malade c'est à dire malade/ résistant. Chaque personne enquêtée a donné son consentement libre et éclairé et toutes les informations recueillies ont été traitées dans le strict respect de l'anonymat et de la confidentialité des personnes (Annexe 01).

La population étudiée est composée de 13 patients (cas) et 08 résistants (témoins).

***Critères d'inclusion**

Les personnes résidant dans la ville de Tlemcen.

Les patients atteints de brucellose

Les personnes ayant des cas de brucellose dans la famille

***Critères d'exclusion**

Les personnes venant consulter hors wilaya de Tlemcen.

I.3. Collecte des données

I.3.1. Questionnaire

Il comporte trois volets (Annexe 1) :

1. l'identification de malade et/ou des témoins
2. contexte épidémiologique et tableau clinique
3. étude génétique

A. Patients (cas)

Le groupe de patients inclus dans cette étude est composé de 13 personnes codées (voir Tableau 6), avec 07 hommes et 06 femmes, les extrêmes d'âge [8-61 ans], souffrant d'une infection à *Brucella*.

La majorité des patients sont des consommateurs du lait cru contaminé, ayant des cas similaires dans l'entourage, avec ou sans notion de zone endémique, avec ou sans notion de contact avec le bétail.

Tableau 6: les patients étudiés

N/code	Région	Age	Sexe
1/01-B17	Chetouane(Amieur)	29ans	Féminin
2/03-B17	Sabra(Bouhlou)	47ans	Masculin
3/04-B17	Tlemcen	45ans	Masculin
4/05-B17	Sabra (Bouhlou)	38ans	Féminin
5/06-B17	Chetouane(Amieur)	11 ans	Féminin
6/07-B17	Chetouane(Amieur)	60ans	Masculin
7/08-B17	Sabra (Bouhlou)	8ans	Féminin
8/09-B17	Sabra (Bouhlou)	61ans	Féminin
9/12-B17	Sabra (Bouhlou)	13ans	Masculin
10/15-B17	Chetouane(Amieur)	17ans	Masculin
11/17-B17	Sabra (Bouhlou)	29ans	Masculin
12/18-B17	Sabra (Bouhlou)	42ans	Masculin
13/21-B17	Sabra (Bouhlou)	32ans	Féminin

B. Résistant (témoin)

Le groupe des résistants à l'infection par *Brucella* est composé de 7 personnes (5 sexe masculin et 2 sexe féminin, avec des extrêmes d'âge 4-50 ans).

Ces personnes sont de la même famille et de la même région que les patients.

Chacun d'entre eux, avait un contact étroit avec des animaux infectés avec *Brucella* et/ou consommait du lait cru.

Tableau 7 : Les résistants étudiés

N/code	Région	Age	Sexe
1/02-B17	Sabra (Bouhlou)	4ans	Masculin
2/10-B17	Sabra(Bouhlou)	11ans	Masculin
3/11-B17	Sabra(Bouhlou)	18ans	Masculin
4/13-B17	Tlemcen	20ans	Masculin
5/14-B17	Sabra(Bouhlou)	28ans	Masculin
6/16-B17	Sabra(Bouhlou)	8ans	Masculin
7/19-B17	Sabra(Bouhlou)	40ans	Féminin
8/20-B17	Sabra (Bouhlou)	31ans	Masculin

I.3.2. Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins sont réalisés au niveau de la veine du pli du coude, le sang a été collecté dans des tubes EDTA.

Les tubes EDTA (anticoagulant et inhibiteur des nucléases, permettant ainsi à l'ADN de rester intact et de ne pas se dégrader), ont permis de constituer une banque d'ADN.



Figure14 : Prélèvement sanguin au pli du coude

I.3.3. Séro-agglutination de Wright (SAW)

Elle met en évidence les immunoglobulines M, dont le taux $> 1/80^{\circ}$ correspond à une brucellose évolutive récente.

La réaction est positive dès le 12^{ème} ou 15^{ème} jour, son taux croît rapidement pour revenir à un taux non-significatif au 4-5^{ème} mois: il est donc négatif dans la brucellose chronique.

Les faux négatifs sont dus à des immunoglobulines A et immunoglobulines G bloquants.

Un Combes indirect permet de les rechercher, et la dilution du sérum met alors en évidence les immunoglobulines Les faux positifs sont possibles lors d'une autre maladie fébrile (Yersinia, choléra...).

***Matériel**

- Portoir pour tubes à hémolyse
- Micropipette à embouts amovibles pour antigène et sérum, ou pipettes de 1 ml graduées
- Tube à hémolyse
- Une étuve à 370 C

***Réactifs:**

- Antigène brucellique pour agglutination est obtenu à partir de culture « Smooth» de Brucella abortus inactivées par la chaleur et le phénol, il est standardisé par rapport au sérum anti-abortus international.
- Sérum du malade conservé à 4 oc.
- Solution d'eau phénolé (chlorure de sodium 8.5 à 9 ; phénol 5 à 5.49 ; l'eau distillée 1000 ml)

***Technique:**

Epreuve de séroagglutination lente de Wright (SAW).

Les dilutions sont effectuées en solution de chlorure de sodium et de phénol.

On prend 10 tubes à hémolyse (pour éviter le phénomène de zone), ou on l'introduit dans le premier tube, puis on prélève 0.5 ml dans les autres tubes.0.2 ml de sérum serait alors ajouté

au premier tube, puis on prélève 0.5 ml de celui-ci-après avoir bien agité et les transvaser dans le second, puis on opère de la même façon du deuxième au troisième tube ainsi de suite.

On obtient dans les dilutions de sérums dans l'eau salée phénolée de 01/10 à 1/5120.

Lorsque les dilutions sériques sont effectuées, on ajoute à chacune des tubes 0.5 ml d'antigène.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on retire les tubes et on les laisse pendant 2 heures à température ambiante pour permettre au sédiment qui sont en suspension de se déposer.

I.3.4. Extraction de l'ADN par la technique NaCl (Salting out)

La technique d'extraction d'ADN par le NaCl a été choisie en raison de sa rapidité, sa facilité ainsi que l'absence du risque d'intoxication par des produits dangereux tels que le phénol. Cette technique comporte les étapes suivantes (Annex 2) :

***Lyse des globules rouges**

Après décongélation au bain marie à 37°C, la lyse des globules rouges est réalisée en complétant le volume de sang avec une solution hypotonique TE 10/10 (Tris/HCl 10mM et EDTA 10mM ; pH = 8,0).

Après lavage, les tubes sont mis dans la glace pendant 30 minutes (l'action conjuguée du Tris et du froid provoque un choc hypotonique conduisant à l'éclatement des globules rouges ayant une membrane fragile.) puis centrifugés à 2500 tours/min pendant 15min.

La centrifugation, quant à elle permet de séparer le surnageant qui contient les débris de globules rouges des globules blancs qui sont précipités au fond du tube formant un culot.

Cette opération de lavage est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre qui correspond aux globules blancs.



Figure 15 : La centrifugeuse de laboratoire

***Lyse des globules blancs**

Le culot de leucocytes est traité par 5ml de solution de lyse des globules blancs (Tris / HCl 10mM ; EDTA 0,1M et SDS 0,5% ; pH = 8,0). 100µl de protéinase K à 20 mg/ml sont additionnés pour digérer les protéines associées à l'ADN nucléaire.

Après homogénéisation, le mélange est incubé au bain-marie à 37°C pendant une nuit. L'EDTA est un chélateur d'ions bivalents inhibant l'activité des DNases et le SDS est un puissant détergent lysant les membranes cellulaires et dissociant les complexes d'acides nucléiques.

***Précipitation de l'ADN**

Deux millilitres de NaCl 5M sont ajoutés dans chaque tube. Après une centrifugation de 10min à 4000 tours/min, le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un autre tube et est précipité avec deux volumes d'éthanol absolu froid. L'ADN est visible à l'œil sous forme de filaments formant une méduse.

Cette dernière est récupérée et ensuite lavée avec une solution d'éthanol à 70% pour se débarrasser des traces éventuelles de sels, puis séchée et dissoute dans des tubes eppendorf en présence de 100 à 600µl de TE10/1 (Tris / HCl 10mM et EDTA 1mM ; pH = 8.0) selon la

taille de la méduse. L'ADN est dissout totalement dans ce tampon sous agitation douce à +4°C pendant plusieurs jours.



Figure 16 : Culot blanc

I.3.5. Dosage de l'ADN

Le dosage de l'ADN est effectué par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie d'un aliquote dilué au 1/100 (20 μ l d'ADN + 1980 μ l d'eau distillée stérile).

Une première lecture à une longueur d'onde de 260nm nous permet d'estimer la densité optique des acides nucléiques. Une seconde lecture est effectuée à une longueur d'onde de 280nm afin de déterminer une éventuelle contamination par les protéines.

Pour avoir un critère de pureté indicatif, le rapport de DO_{260nm}/280nm est établi. Il doit être compris entre 1.8 et 2. Une valeur inférieure à 1.8 témoigne d'une contamination par les protéines, et une valeur supérieure à 2 d'une contamination par les sels.

L'estimation de la concentration de l'ADN est déterminée selon la formule suivante :

1 unité de DO 50 ng d'ADN

N unités de DO 50 \times N ng d'ADN

$$[\text{ADN}] = \text{DO } 260 \times \text{facteur de dilution} \times 50 \text{ en}$$

Tableau 8: Indications pour l'évaluation du degré de pureté d'ADN

RATIO	valeur	INDICATION DE PURETE
260/280	Entre 1.8 et 2	ADN pur
	<1.8	Présence de protéines
	> 2	Contamination par l'ARN ou les sels

I.3.6. Conception des amorces pour la PCR

La conception des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. Toutes choses égales par ailleurs, une amorce mal conçue peut empêcher le fonctionnement de la réaction PCR.

La séquence d'amorce détermine plusieurs choses, telles que la position et la longueur du produit, sa température de fusion et finalement le rendement (Innis et Gelfand, 1994).

Une amorce mal conçue peut conduire à une production faible, voire nulle, en raison d'une amplification non spécifique et/ou à la formation de dimères d'amorce, qui peuvent devenir suffisamment compétitifs pour inhiber la formation de produit.

Cette note d'application a pour but d'établir des règles dont il convient de tenir compte lors de la conception d'amorces pour la PCR. Ce sujet est traité plus en détail dans d'autres publications (Dieffenbach et al., 1995).

***Sélection des amorces**

Plusieurs variables doivent être prises en considération lors de la conception des amorces pour la PCR. En voici quelques-unes des plus importantes:

- longueur de l'amorce,
- température de fusion (T_f),
- spécificité,
- séquences d'amorce complémentaires
- teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G),
- séquence à l'extrémité 3'.

Chacun de ces éléments essentiels est examiné dans les sections suivantes.

***Longueur de l'amorce**

Comme la spécificité, la température et le temps d'hybridation dépendent en partie de la longueur de l'amorce, ce paramètre est essentiel pour le succès de la PCR.

En général, les oligonucléotides entre 18 et 24 bases sont extrêmement spécifiques de la séquence, à condition que la température d'hybridation soit optimale.

La longueur de l'amorce est également proportionnelle à l'efficacité de l'hybridation. En général, plus l'amorce est longue, moins l'hybridation est efficace. Le nombre de matrices amorcées diminuant à chaque étape, cela peut aboutir à une diminution sensible de produit amplifié.

Les amorces ne devraient toutefois pas être trop courtes, à moins que l'application l'exige spécifiquement. Comme indiqué ci-dessous, l'objectif est de concevoir une amorce dont la température d'hybridation est d'au moins 50 °C.

La relation entre la température d'hybridation et la température de fusion est l'une des «boîtes noires» de la PCR.

Une règle générale est d'utiliser une température d'hybridation qui est 5 °C plus basse que la température de fusion. Souvent, la température d'hybridation déterminée de cette façon ne sera pas optimale et il faudra procéder empiriquement pour déterminer la température optimale. À cet effet, le plus facile est d'utiliser un thermocycleur à gradient.

***Température de fusion (T_f)**

Se situera entre 56 et 62 °C il faut que les deux températures de fusion de l'amorce sens et anti sens soient proche l'une de l'autre.

***Spécificité**

Comme mentionné plus haut, la spécificité de l'amorce dépend au moins partiellement de la longueur de l'amorce. Il est évident qu'il y a beaucoup plus d'oligonucléotides uniques à 24 paires de bases qu'à 15 paires de bases.

Ceci dit, les amorces doivent être choisies de telle sorte qu'elles aient une séquence unique dans l'ADN matrice qui doit être amplifié. Une amorce conçue avec une séquence hautement répétitive conduira à une traînée lors de l'amplification d'ADN génomique.

Toutefois, la même amorce peut donner une bande unique si un clone unique d'une bibliothèque génomique est amplifié.

Comme l'ADN polymérase Taq est actif dans une large gamme de températures, l'extension de l'amorce se produira aux basses températures d'hybridation. Si la température est trop basse, un amorçage non spécifique peut se produire qui peut être étendu par la polymérase s'il y a une homologie courte à l'extrémité 3'.

En général, une température de fusion de 55– 72 °C donne les meilleurs résultats (à noter que cela correspond à une longueur d’amorce de 18–24 bases avec la règle de Wallace).

***Séquences d’amorce complémentaires**

Les amorces doivent être conçues absolument sans aucune homologie intra-amorce au-delà de 3 paires de bases. Si une amorce possède une telle région d’autohomologie, des structures partiellement doubles brin en «épingles à cheveux» peuvent se former, qui perturberont l’hybridation avec la matrice.

Un autre risque connexe est l’homologie inter-amorce. L’homologie partielle dans les régions centrales de deux amorces peut interférer avec l’hybridation. Si l’homologie se situe à l’extrémité 3’ de l’une ou de l’autre amorce, la formation de dimères d’amorce se produira, ce qui, par compétition, empêchera le plus souvent la formation du produit désiré.

***Teneur en G/C et suites polypyrimidine (T, C) ou polypurine (A, G)**

Les amorces devraient être composées à 45-55 % de GC. La séquence d’amorce doit être choisie de telle sorte qu’il n’y ait aucune suite poly-G ou poly-C pouvant promouvoir une hybridation non spécifique.

Les suites poly-A and poly-T doivent également être évitées, car elles «respireront» et ouvriront des parties du complexe amorce-matrice. Cela peut réduire l’efficacité de l’amplification. Les suites polypyrimidine (T, C) et polypurine (A, G) devraient également être évitées. Idéalement, l’amorce présentera un mélange presque aléatoire de nucléotides, une teneur de 50 % en GC et une longueur d’environ 20 bases. La T_f se situera alors entre 56 et 62 °C (Dieffenbach et al., 1995).

***Séquence à l’extrémité 3’**

Il est établi que la position terminale 3’ dans les amorces PCR est essentielle pour empêcher le mésamorçage.

Le problème des homologies d’amorce se produisant dans ces régions a déjà été examiné. Une autre variable à considérer est l’inclusion d’un résidu G ou C à l’extrémité 3’ des amorces.

Ce « crampon GC » contribue à la fixation correcte à l’extrémité 3’ en raison de la liaison hydrogène plus forte des résidus G/C. Cela contribue également à une plus grande efficacité de la réaction en réduisant au minimum la «respiration» qui pourrait se produire.

I.3.7. Gène codant TNF alpha

Le gène de TNF α est situé sur le chromosome 6 au sein même du système majeur d'histocompatibilité.

le TNF α est produit par de nombreuses cellules : macrophages, monocytes, lymphocytes T et B, kératinocytes, cellules mésangiales, épithéliales, endothéliales, basophiles et mastocytes, polynucléaires neutrophiles, et éosinophiles, fibroblastes....

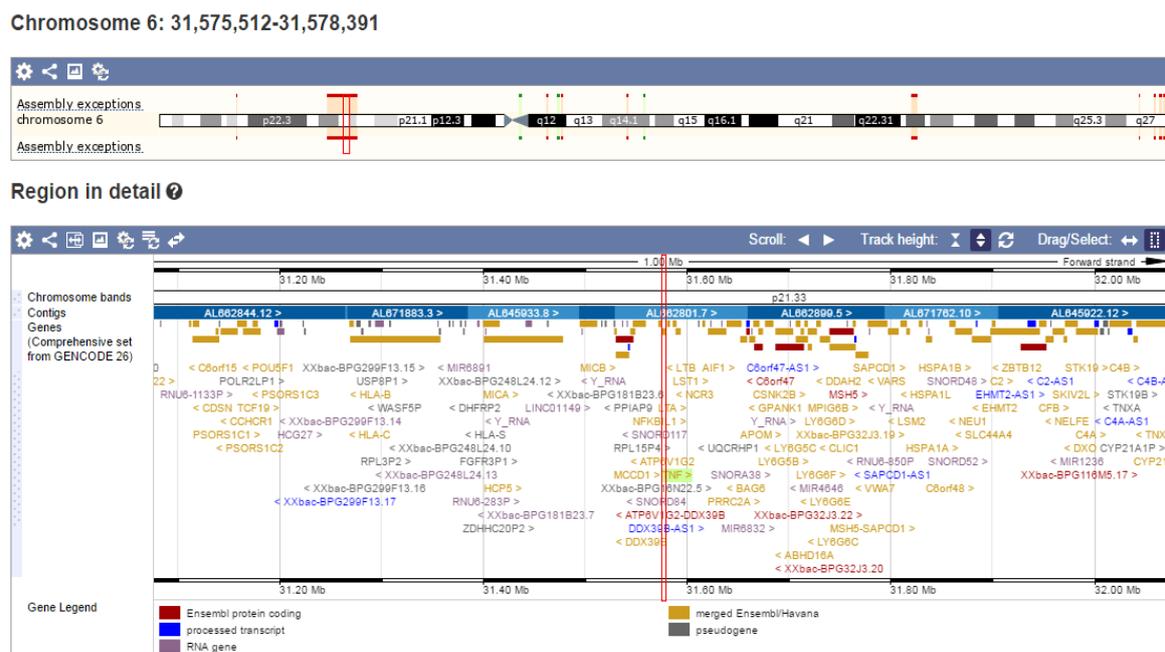


Figure 17: Localisation du gène *TNF alpha*

- Recherche de la séquence de référence du gène TNF alpha :

La conception des amorces encadrant le TNF commence par la recherche de la séquence de référence du gène TNF, pour cela la base de donnée <Ensembl> est utilisé grâce au site «www.ensembl.org s' comme montré dans la Figure

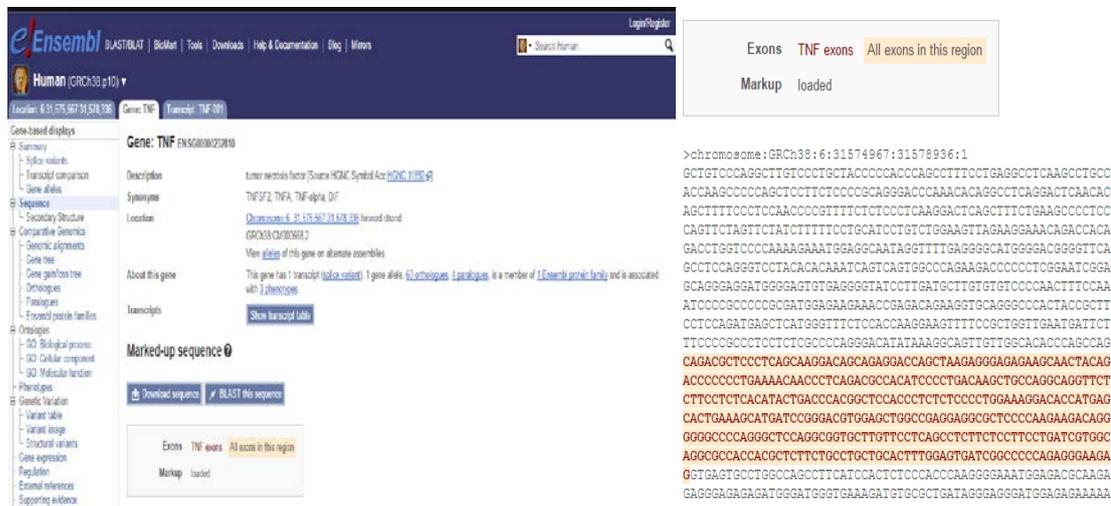


Figure 18: Séquence du gène *TNF* par le site Ensembl, sont représenté en noir les séquences non codante, en rouge les exons

Cette séquence est copiée dans un document Word, et la séquence d'intérêt est encadrée, comme montré dans la figure; pour faciliter notre recherche des amorces encadrant le TNF.

- **Le design des Primer:**

Dans les ressources du National Center for Biotechnology Information (NCBI) nous avons utilisé le logiciel Primer blast dans le site « www.ncbi.nlm.nih.gov » afin de concevoir les amorces recherchées.

The image shows the Primer-BLAST web interface. At the top, it says "Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)". Below this, there are several sections:

- PCR Template:** A text area containing a DNA sequence. To the right, there is a "Range" section with "From" and "To" input fields. The "Forward primer" is set to 1 and the "Reverse primer" is set to 552.
- Primer Parameters:** This section includes input fields for "Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)", "Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)", "PCR product size" (with "Min" and "Max" sub-inputs), "# of primers to return", and "Primer melting temperatures (T_m)" (with "Min", "Opt", "Max", and "Max T_m difference" sub-inputs).
- Exon/intron selection:** This section includes a dropdown menu for "Exon junction span" (set to "No preference") and input fields for "Exon at 5' side" (set to 7) and "Exon at 3' side" (set to 4).

Figure 19: L'outil primer blast



Résultats

II. Resultats

II.1. Caractéristiques sociodémographiques

II.1.1. Répartition des cas selon l'âge

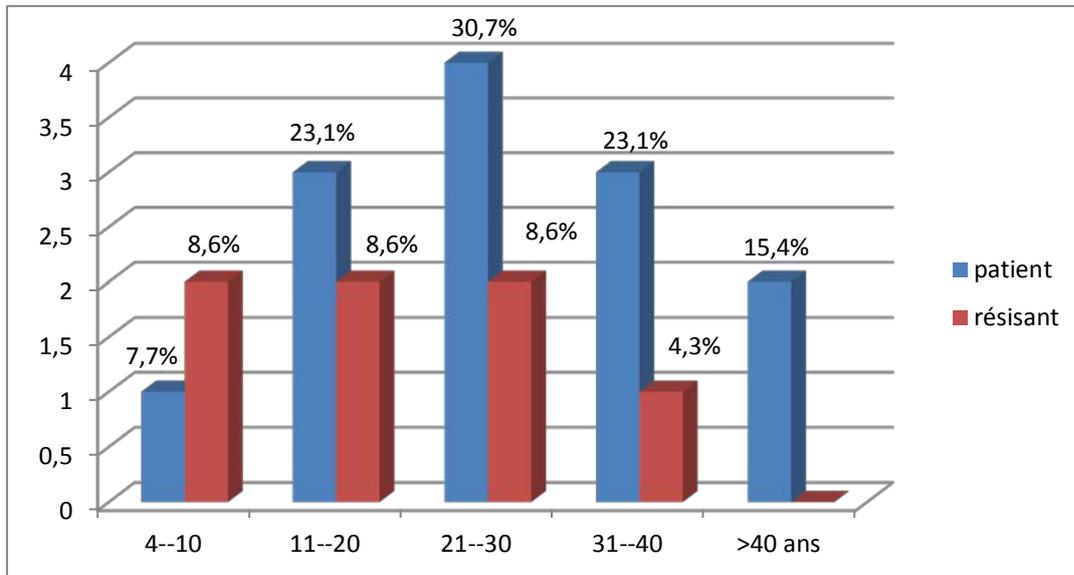


Figure 20 : Répartition des cas selon l'âge

L'âge moyen des patients est de 33,23 ans, et il est de 20 ans pour les cas résistants.

Pour les patients, la tranche d'âge la plus touchée (classe modale) est celle des [21-30 ans] avec une fréquence relative de 31%, suivie de classes des [11-20 ans] et [31-40 ans], avec des fréquences égales de 23%.

II.1.2. Répartition des cas selon le sexe



Figure 21: Répartition des cas selon le sexe

Il y a une prédominance masculine (62%) avec un sex ratio de 1,62.

II.1.3. Répartition des cas selon la profession

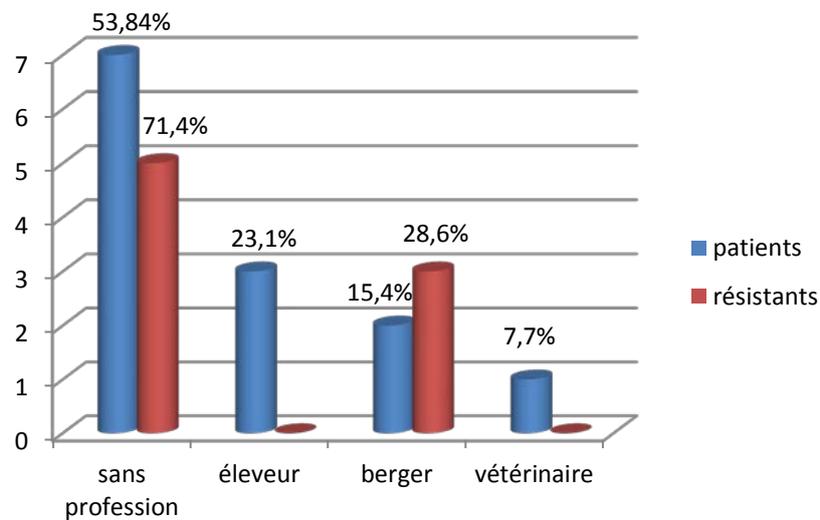


Figure 22 : Répartition des cas selon la profession

Plus de la moitié des patients sont sans profession, ce qui est en rapport avec la fréquence de la contamination indirecte par voie digestive.

II.1.4. Répartition des cas selon l'état matrimonial

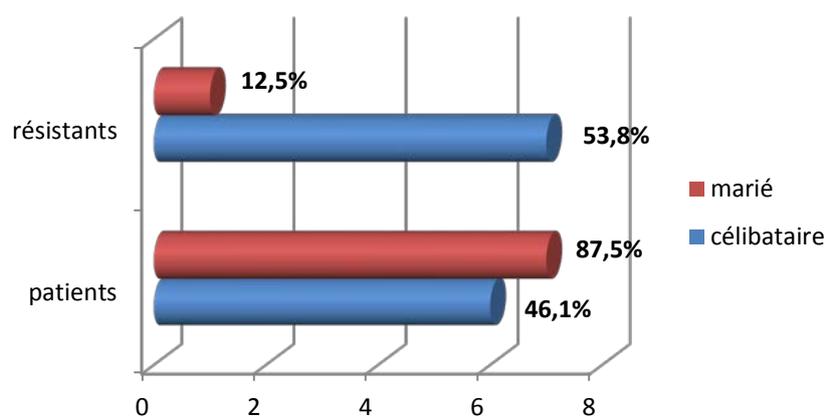


Figure 23 : Répartition des cas selon l'état matrimonial

Pour les patients, le statut « mariage » est prédominant, avec une fréquence de 87,5%, néanmoins, le statut « célibataire » est prépondérant chez les résistants (54%).

II.1.5. Répartition selon le contexte épidémiologique

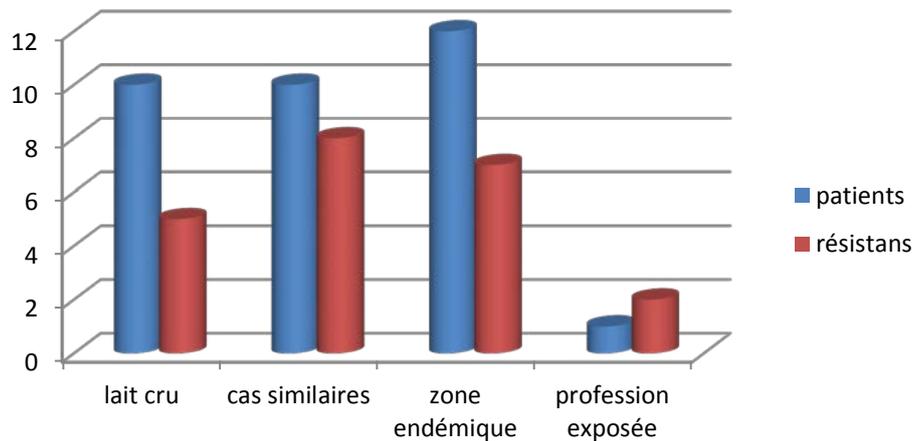


Figure 24 : Répartition selon le contexte épidémiologique

L'appartenance à la zone endémique et l'ingestion du lait cru, sont majeurs pour les patients et les résistants.

II.1.6. Répartition selon les symptômes cliniques

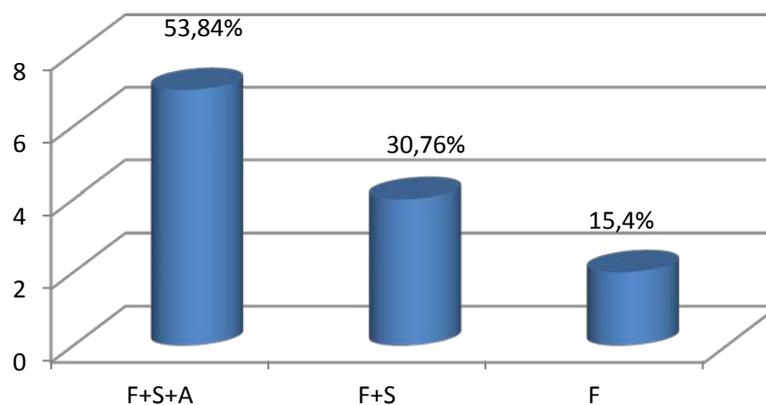


Figure 25 : Répartition selon les symptômes cliniques

La forme typique « fièvre sudéro algique » est prédominante chez les patients, avec une fréquence de 54%.

II.1.7. Répartition selon le traitement

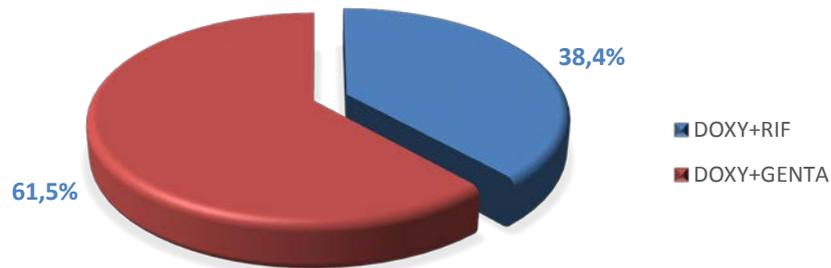


Figure 26: Répartition selon le traitement

61,5% des patients ont été traité par la bithérapie « Doxycycline + gentamycine » pour la forme septicémique commune, et seuls 38,4% des cas ayant reçu la bithérapie « Doxycycline + rifampicine » pour la forme focalisée.

II.1.8. Répartition des cas selon l'évolution

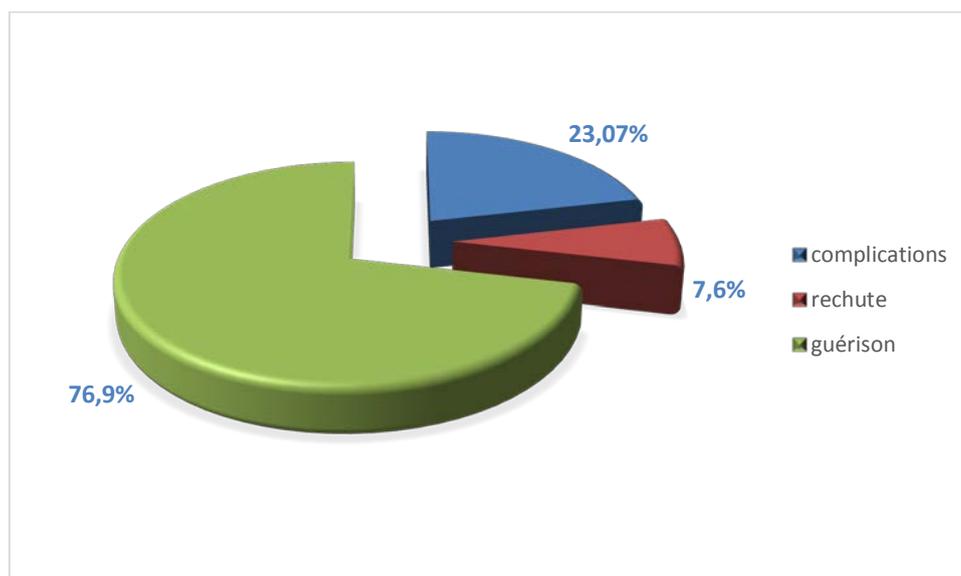


Figure 27: Répartition selon l'évolution

La majorité des patients (77%) avait une évolution favorable avec guérison, 23% des patients avaient des complications de la brucellose, et seuls 7,6% ont présenté des rechutes.

II.2. Caractéristiques génétiques

- **Exploration des données de l'ADN**

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire.

L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques dans le cas présent est d'obtenir des acides nucléiques purifiés, afin de pouvoir mener une analyse spécifique de détection de polymorphismes génétiques en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. La quantification de l'ADN et la détermination de sa pureté a été réalisée grâce à la spectrophotométrie, en utilisant la longueur d'onde 260 nm qui sont la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques.

- **Dosage**

Le rapport R entre la longueur d'onde 260/280 nous permet de savoir s'il y a présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

Un rapport ($R = 260/280$ nm) inférieur à 1,8 nous indique une contamination aux protéines, par contre un rapport supérieur à 2 nous indique une contamination par les sels.

1. Les Patients

Tableau 9 : Résultats des dosages de l'ADN extrait des patients atteint de Brucellose

	A	B	C	D	E
1	N/code	DO260	DO280	DO 260/280	Concentration d'ADN ng/ul
2	1/01-B17	0,0792	0,0698	1,13467049	396
3	2/03-B17	0,0436	0,0293	1,48805461	218
4	3/04-B17	0,063	0,0574	1,09756098	315
5	4/05-B17	0,09	0,0758	1,18733509	450
6	5/06-B17	0,0546	0,0412	1,32524272	273
7	6/07-B17	0,2336	0,1619	1,44286597	1168
8	7/08-B17	0,0534	0,0422	1,26540284	267
9	8/09-B17	0,1617	0,1469	1,10074881	808,5
10	9/12-B17	0,0797	0,0688	1,15843023	398,5
11	10/15-B17	0,0369	0,0341	1,08211144	184,5
12	11/17-B17	0,1109	0,0964	1,15041494	554,5
13	12/18-B17	0,1449	0,1468	0,98705722	724,5
14	13/21-B17	0,1196	0,0917	1,304253	598

Le dosage des ADN extrait des malades montrent de bonnes concentrations entre 218 et 1168 ng/ul pour les 13 ADN dosés.

Le calcul du rapport Do 260/280 montre que les 13 ADN contaminés par les protéines. Cela dit le dosage doit être refait par un autre spectrophotomètre afin de confirmer ces résultats

2. Les Résistants :

Tableau 10: Résultats des dosages de l'ADN extrait des sujets résistants à la brucellose

	A	B	C	D	E
1	N/code	DO260	DO280	DO 260/280	Concentration d'ADN ng/ul
2	1/02-B17	0,0605	0,0499	1,21242485	302,5
3	2/10-B17	0,0141	0,0086	1,63953488	70,5
4	3/11-B17	0,0898	0,0774	1,16020672	449
5	4/13-B17	0,0506	0,0414	1,22222222	253
6	5/14-B17	0,2024	0,1624	1,24630542	1012
7	6/16-B17	0,0748	0,0673	1,11144131	374
8	7/19-B17	0,1279	0,1053	1,21462488	639,5
9	8/20-B17	0,1179	0,0961	1,22684703	589,5

Le dosage des ADN extrait des résistants de la maladie brucellose montrent de bonnes concentrations entre 70,5 et 1012 ng/ul pour les 8 ADN dosés.

Le calcul du rapport Do 260/280 montre que les 8 ADN contaminés par les protéines. Cela dit le dosage doit être refait par un autre spectrophotomètre afin de confirmer ces résultats.

- **Résultats de la conception des amorces (TNF alpha)**

La paire d'amorce est spécifique pour amplifier un produit de 445 paires de bases, Les résultats obtenus par primer blast montrent deux amorces Forward et Reverse de 21 et 23 oligonucléotides de longueur respectivement. La température de fusion de chacune d'elle est optimale et l'écart entre les deux températures est acceptable (60,27°C- 62,51°C).

Le pourcentage en GC dans les deux amorces Forward et Reverse est respectivement de 57,14 et 56,51 ce qui est favorable à une bonne hybridation spécifique.

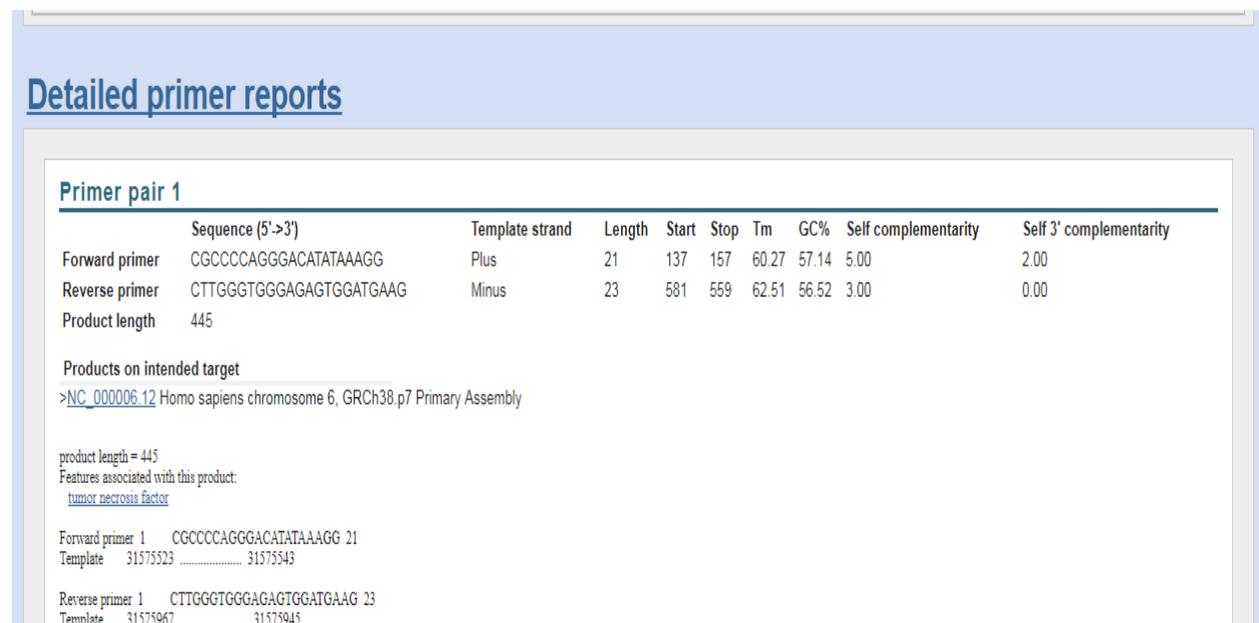
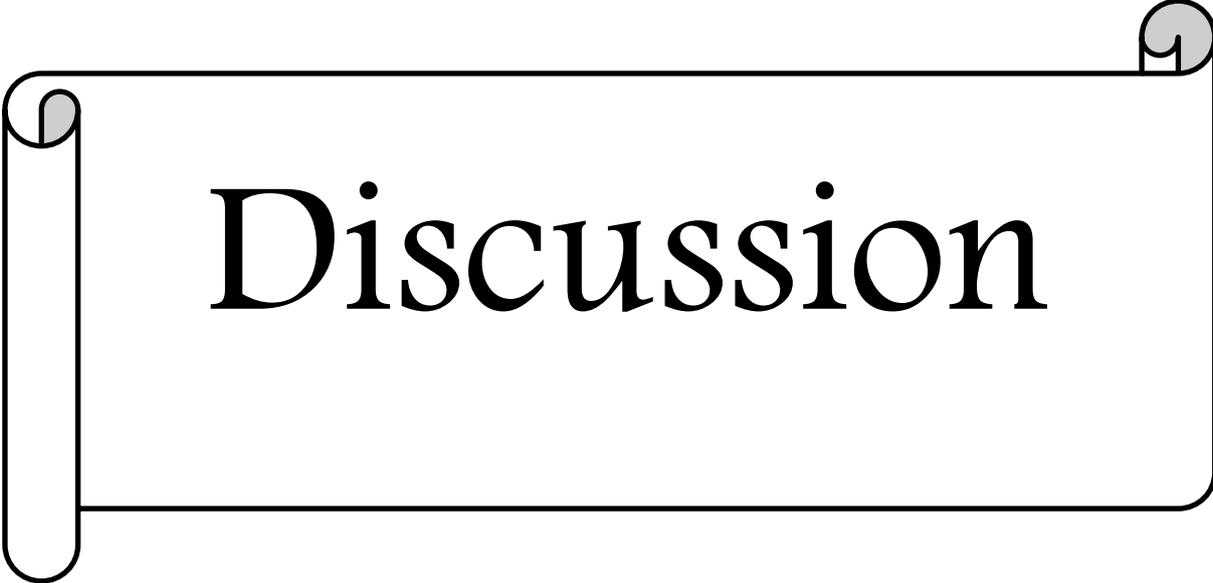


Figure 28: Résultat du Primer blast



Discussion

Discussion

La brucellose est endémique dans le bassin méditerranéen, en particulier dans les pays d'Afrique du Nord (Pappas et al., 2006, Seleem et al., 2010).

En Algérie, elle reste encore endémique jusqu'à ce jour, posant un problème de santé publique aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Plusieurs cas sont enregistrés tous les ans et déclarés à l'INSP Alger

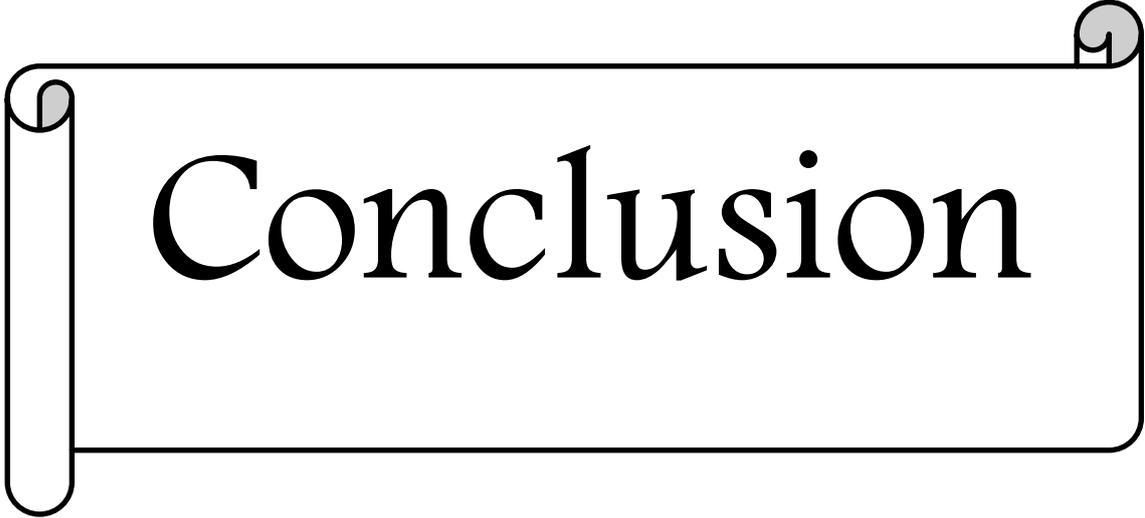
Dans la présente étude, sur 21 cas déclarés au niveau du service des maladies infectieuses, CHU de Tlemcen, l'âge moyen des patients est 33,23 ans et celui des cas résistants est de 20 ans, la tranche d'âge plus touchée est de [21-30]ans, avec une fréquence relative de 30,76%, ce qui est comparable avec l'étude menée à Sidi belabbes, par Tabet et coll. (Tabet- Derraz et al., 2011) avec une fréquence de 31,84%. Ce sont les jeunes adultes professionnellement exposés.

La brucellose touche plus fréquemment les hommes (61,9%) par rapport au sexe féminin (38,1%) avec un sex ratio de 1,62, ces résultats sont similaires à ceux retrouvés dans l'étude de Tabet et coll. (Tabet- Derraz et al., 2011) avec une fréquence de 61,08% chez les hommes et 38,91% chez les femmes, cette prédominance masculine est liée aux activités professionnelles de l'élevage (éleveurs, vétérinaires, agriculteurs etc.), ils sont donc, plus exposés au risque de contamination, vu leur contact direct avec le bétail.

Par ailleurs, dans l'étude menée à Batna par Mahdjoub et coll. (Mahdjoub et al., 2013), une prédominance féminine a été démontrée, avec un sex ratio de 0,63, ceci pouvant être expliqué par l'exposition fréquente des femmes à la maladie lors de l'élevage.

Concernant l'exposition alimentaire aux produits laitiers non pasteurisés, dans notre série, les résultats ne font que confirmer l'importance de la consommation des produits non pasteurisés par la population générale avec 71,42% de personnes qui consomment au moins un produit laitier non pasteurisé. Cependant, la majorité des personnes 'patients /résistants' (90,47%) sont originaires de zones endémiques.

Nous avons réalisé au cours de cette étude un recrutement de patients atteints de Brucellose ainsi que des résistants pour tous ces individus une extraction d'ADN, à partir du sang total, a été effectuée. Les polymorphismes génétiques restent encore à être explorer. Dans cet essor on a réalisé une banque d'ADN en utilisant la méthode d'extraction au NaCl (Salting out), afin de pouvoir mener une analyse spécifique de détection de ces polymorphismes en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le dosage des ADN extrait des malades montrent de bonnes concentrations entre 218 et 1168 ng/ul pour les 13 ADN dosés. Le calcul du rapport Do 260/280 montre que les 13 ADN contaminés par les protéines. Et pour le dosage des ADN extrait des résistants de la maladie brucellose montrent de bonnes concentrations entre 70,5 et 1012 ng/ul pour les 8 ADN dosés. Le calcul du rapport Do 260/280 montre que les 8 ADN contaminés par les protéines. Cela signifie que les dosages doivent être refait par un autre spectrophotomètre afin de confirmer ces résultats.



Conclusion

CONCLUSION

La brucellose reste une infection d'actualité par l'importance de sa diffusion mondiale. Son impact sur la santé publique est révélé par le nombre élevé des cas humains déclarés.

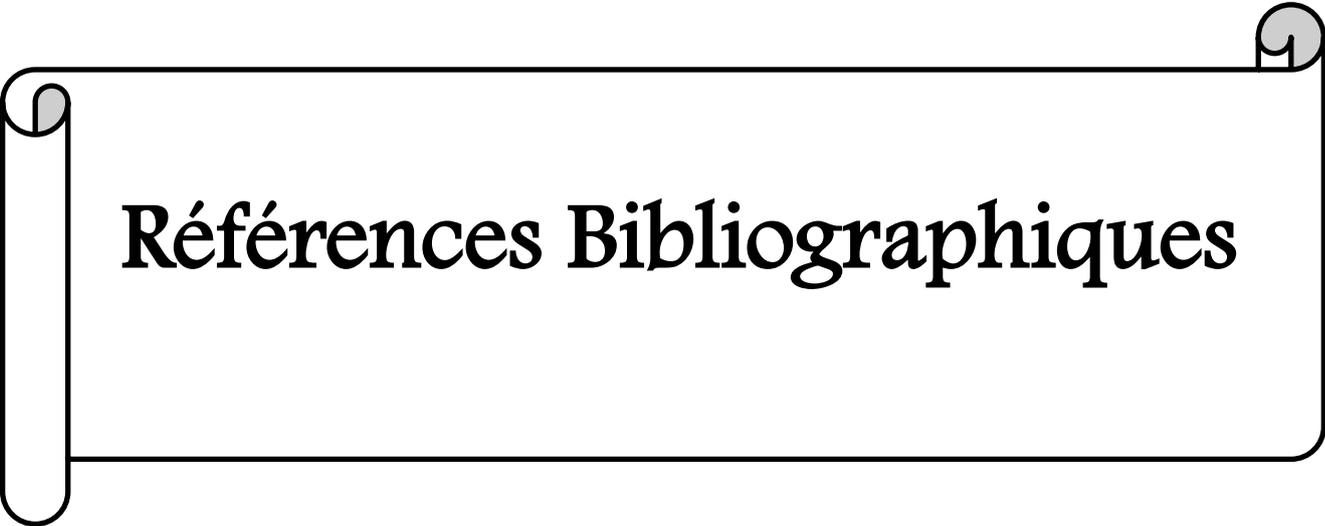
La population jeune et la profession d'éleveur étaient les plus touchées. Elle frappe le plus souvent des hommes en pleine période d'activité professionnelle

Dans notre étude, le recrutement des patients atteints de Brucellose ainsi que des membres de leur famille ayant consommé les mêmes aliments, et n'ayant pas contracté la maladie, dits « résistants », puis l'extraction d'ADN, à partir du sang total, ont été réalisés.

Le dosage de l'ADN a montré 21 ADN contaminés par les protéines. Les séquences des amorces encadrant le gène, ont été conçues par l'outil de Primer-Blast.

Les perspectives de cette étude est de réaliser un génotypage au niveau de la région promotrice du gène TNF alpha, des patients et des résistants Algériens, afin réaliser une étude comparative cas-témoins. Ce travail nous a permis de nous initier aux techniques de biologie moléculaire.

En effet, nous pouvons réaliser des prélèvements sanguins, des extractions et des dosages d'ADN en toute autonomie. De même, durant la période de ce travail un stage a été réalisé au niveau du CHU Tlemcen.



Références Bibliographiques

Référence bibliographique

A

Akhvlediani T et al. " The changing pattern of human brucellosis : clinical manifestations, epidemiology, and treatment outcomes over three decades in Georgia.BMC Infectious Diseases 2010, 10 : 346."

Akira, S. "Mammalian Toll like receptors. Current opinion in immunology .2003.15, p. 5-11. ."

Alton GG., Jones LM., Angus RD. and et Verger JM. "Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 1988."

Audic S., Lescot M., Claverie JM. and Scholz HC. " Brucella microti: the genome sequence of an emerging pathogen. BMC Genomics. 2009. 10, 352."

AVIQ agence pour vie de qualité BRUCELLOSE version Juillet 2016 p 2."

B

Bachrach G., Banai M., Bardenstein S., Hoida G., Genizi A. and Bercovier H. "Brucella ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of brucellin INRA for delayed-type hypersensitivity in brucella-sensitized guinea pigs. Infect. Immun. 1994.62, 5361-5366."

Baily GG., Krahn JB., Drasar BS. and Soker NG. "Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg.1992. 95, 271–275."

Benhabyles, N. "(1992), "La brucellose: données fondamentales", R.E.M., vol III, N°2, INSP."

Benkirane A. "Surveillance épidémiologique et prophylaxie de la brucellose des ruminants. Rev Sci Tech 2001 ; 20 : 757-67."

Boualem B.H., Belkadi S.A. and Benabdellah A. "Brucellose. Elsevier masson. Science Direct. 2009. pp1

Références bibliographiques

Bouzouaia N., Chakroun M., Rachdi J. and Rachdi T. " Aspects épidémiologiques et thérapeutiques de la brucellose en Tunisie. Tunisie Médicale 1995 ; 11 : 443-8."

Bricker BJ., Tabatabai LB., Deyoe BL. and Mayfield JE. "Conservation of antigenicity in a 31-kDa Brucella protein. Vet. Microbiol. 1988. 18, 313-325."

Balin, A. La Brucellose chez les mammifères marins échoués sur les côtes françaises de la Manche de 1995 à nos jours : enquêtes épidémiologique et anatomo-pathologique. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 245 p. 29-30."

C

Cardoso PG., Macedo GC., Azevedo V. and Oliveira SC. "Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Factories. 2006.5, 13."

"Carvalho-nota A., Mol j., xavier M., Paixao T., Lage A., Santos R. Pathogenesis of bovine brucellosis. The Veterinary Journal, .2010, 184(2), 146-155."

Cekanac et al. "Epidemiological Characteristics of Brucellosis in Serbia, 1980-2008 ; Croat Med J. 2010; 51: 337-44."

Chakroun M. and Bouzouaia N. "Brucellose. Rev Tun Infectiol, Avril 07, Vol 1, N°2, 1 - 10."

Cloeckaert A., Baucheron S., Vizcaino N. and Zygmunt MS. " Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001.8(4), 772-775."

"Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose, cinquième rapport, Genève, 29 juin-6 juillet 1970. Ouvrage du FAO ET L'OMS organisation nationale de la santé, 1971."

"Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose, cinquième rapport, Genève, 29 juin-6 juillet 1970. Ouvrage du FAO ET L'OMS organisation nationale de la santé, 1971."

Corbel MJ. "Brucellosis: an overview. Emerg. Infe. ct. Dis. 1997.3(2), 213-221. Review."

D

Dauphinee, S. M. and A. Karsan " Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology . 2006. 86, 9: p. 22. ."

Detilleux PG., Deyoe BL. and Cheville NF. "(1990) Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. Infect. Immun. 58(7), 2320-2328."

De figueiredo P., Ficht T., Rice-ficht A., Rossetti C. et Adams L. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis Review of *Brucella*-Host Interactions, The American Journal of Pathology, 2015. 185 (6), p. 1505-1517."

Durr U., Valenciano M. and Vaillant V. "(2003) La brucellose humaine en France de 1998 à 2000. Surveillance Nationale des maladies infectieuses. Institut de Veille Sanitaire. Rapport 1998-2000."

F

Fiers, W. " Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. FEBS letters.1991. 285, p. 199-212."

Freer E., Moreno E., Moriyón I., Pizarro-Cerdá J., Weintraub A. and Gorvel JP. "Brucella-Salmonella lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. J. Bacteriol. 1996.178(20), 5867-5876."

Freer E., Rojas N., Weintraub A., Lindberg AA. and Moreno E. "Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. ResMicrobiol.1995.146, 569–578. ."

G

Gándara B., Lopez Merino A., Antonio Rogel M. and Martinez-Romero E. "Limited genetic diversity of *Brucella* spp. J. Clin. Microbiol. 2001. 39, 235–40."

Garin-Bastuji B. "(1993b) Le lipopolyoside S des *Brucella* en phase S : approche immunochimique – intérêt dans le diagnostique des brucelloses. Thèse Dr. Univ. Tours. pp 281."

Garin-Bastuji B. and et Delcueille F. "Les brucelloses humaine et animales en France en l'an 2000. Situation épidémiologique – Programmes de contrôle et d'éradication. Méd. Mal. Infect. 2001. Volume 31, Suppl 2, 202-216."

Ghirani. F., Hadjila. A., Ghezri. N. and Hadj-Kadour. A. "Brucellose humaine. Mémoire pharmacie, 2010/2011, p. 4. ."

Goldbaum FA., Leoni J., Wallach JC. and Fossati CA. "Characterization of an 18 kilodalton Brucella cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol. 1993.31(8), 2141- 2145."

Gomes Cardoso P., Costa Macedo G., Azevedo V. and and Costa Oliveira S. " Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Factories. 2006.5, 13."

Gorvel JP. and Moreno E. " (2002) Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet. Microbiol. 90(1-4), 281-297."

H

Halling SM. and and Zehr ES. "Polymorphism in Brucella spp. due to highly repeated DNA. J. Bacteriol. 1990. 172(12), 6637-6640."

Halling SM., Detilleux PG., Tatum FM., Judge BA. and Mayfield JE. "Halling SM, Detilleux PG, Tatum FM, Judge BA, Mayfield JE. Deletion of the BCSP31 gene of Brucella abortus by replacement. Infect. Immun. 1991.59(11), 3863-3868."

Hubálek Z., Scholz HC., Sedláček I., Melzer F., Sanogo YO. and Nesvadbová J. "Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). Vector Borne Zoonotic Dis. Winter, 2007. 7(4), 679-687."

I

Innis, M.A., and Gelfand, D.H. (1994). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Eds.) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. London: CRC Press, pp. 5–11.

INVS: Institut de Veille Sanitaire France.
"Brucellose., <http://www.invs.sante.fr/surveillance/brucellose/default.htm> "

INSP, relevés épidémiologiques annuels 1980-2011, Algérie

J

Janbon F. "Brucellose. *Encycl Méd Chir, - Maladies Infectieuses* 2000 ; 8-038-A-10, 11 p. ."

Jumas-Bilak E., Michaux-Charachon S., Bourg G., Ócallaghan D. and and Ramuz M. "Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.*1998. 27, 99–106."

K

Khettab.S., Taleb .L. and Boudjemaa .W. "la brucellose. *Mémoire pharmacie*, 2009/2010. p.16."

Khettab.S., Talleb .L. and Boudjemaa .W. " *Mémoire pharmacie*, thème la brucellose 2009/2010. pp18."

Ko J. and and Splitter GA. "(2003) Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin.Microbiol. Rev.* 16, 65–78."

Kumar S., Tuteja U. and Batra HV. "Generation and Characterization of Murine Monoclonal Antibodies to Recombinant 26-kDa Periplasmic Protein of *Brucella abortus*.*Hybridoma.*2007.26(5), 322-327."

Kumar S., Tuteja U., Kumar A. and Batra HV. " Expression and purification of the 26 kDa periplasmic protein of *Brucella abortus*: a reagent for the diagnosis of bovine brucellosis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2008. 49(Pt 3), 213-218."

L

Lapaque N., Moriyon I., Moreno E. and Gorvel JP. " *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005. 8, 60-66."

Letesson JJ., Tibor A., van Eynde G., Wansard V., Weynants V., Denoel P. and Saman E. "Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *ClinDiagn. Lab. Immunol.* 1997.4(5), 556-564."

Li, X., J. C. Tupper, D. D. Bannerman, R. K. Winn, C. J. Rhodes and et al. " Phosphoinositide 3 kinase mediates Toll like receptor 4!induced activation of NF kappa B in endothelial cells. *Infection and Immunity*.2003. 71, p. 4414-4420. ."

Liautard JP., Gross A., Dornand J. and Köhler S. "(1996) Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia Review*.. 12(2), 197-206. ."

M

Mahdjoub H., Benyahia A., Kalla N., Ait Hamouda R., Mokrani K. and Tebbal S. "La Brucellose humaine : cohorte de 121 cas. *JNI* 2013."

Matar GM., KhneisserI A. and Abdelnoor AM. "Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Microbiol*.1996. 34, 477–478."

Mailles A, Vaillant V. Etude sur les brucelloses humaines en France métropolitaine, 2002 2004; INVS 2007 disponible sur : http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=4036
Mailles A. et Vaillant V. les brucelloses humaines déclarées en France en 2001 et 2002:Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003. Saint Maurice : Institut de veille sanitaire.

Maurin M. "La brucellose à l'aube du 21ème siècle. *Med Mal Infect* 2005 ; 35 : 6-16."

Mayfield JE., Bricker BJ., Godfrey H., Crosby RM., Knight DJ., Halling SM., Balinsky D. and Tabatabai LB. " The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene*.1988.63(1), 1-9."

Michaux-Charachon S., Bourg G., Jumas-Bilak E., Guigue-Talet P., Allardet-Servent A., O'Callaghan D. and Ramuz M. "Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol*.1997. 179, 3244–3249."

Michaux-Charachon S., Foulongne V., O'Callaghan D. and Ramuz M. "(2002) *Brucella* at the dawn of the third milenium: genomic organization and pathogenesis. *Pathol. Biol. (Paris)*. 50(6), 401-412. Review."

Michaux S., Paillisson J., Carles-Nurit MJ., Bourg G., Allardet-Servent A. and Ramuz M. "Presence of two indépendant chromosomesin the *Brucella melitensis* genome. *J.Bacteriol*. 1993. 175, 701-705."

Miyake, K. " Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4MD2. Seminars in immunology.2004. 16, p. 11-16."

Morata P., Queipo-Ortuno MI. and Colmenero JD. " Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. J.Clin. Microbiol.1998.36, 2443–2446."

Morata P., Queipo-Ortuno MI., Reguera JM., Miralles F., Lopez-Gonzales JJ. and Colmenero JD. "Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. J. Clin. Microbiol.2001. 39, 3743–3746."

Moreno E., Stackebrandt E., Dorsch M., Wolters J., Busch M. and Mayer H. "Brucella abortus 16SrRNA and lipidA reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. J. Bacteriol. 1990.172, 3569–3576."

Mourez M., Jéhanno M., Hofnung M. and Dassa E. " Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). Médecine/sciences.2000.vol.16, 3, 386-394."

O

O'Callaghan D., Cazevaille C., Allardet-Servent A., Boschioli ML., Bourg G., Foulongne V., Frutos P., Kulakov Y. and Ramuz M. " A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. Mol. Microbiol. 1999 . 33(6), 1210-1220 "

Office International des Epizooties. Norme de qualité et lignes directrices de l'OIE applicables aux laboratoires vétérinaires: maladies infectieuses. Deuxième édition, 2008.p.72."

O'Hara MJ., Collins DM. and De Lisle GW. " Restriction endonuclease analysis of Brucella ovis and other Brucella species. Vet. Microbiol. 1985. 10, 425–429."

P

Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M. and Tsianos E. "Brucellosis. N. Engl. J. Med. 2005.352(22), 2325-2336. Review."

Pappas G., Panagopoulou P., Christou L. and Akritidis N. "Brucella as a biological weapon. Cell Mol. Life Sci (2006b) . 63(19-20), 2229-2236."

Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L. and Tsianos EV. "The new global map of human brucellosis. *Lancet. Infect. Dis.* 2006, 6(2), 91-99."

Paulsen IT., Seshadri R., Nelson KE., Eisen JA., Heidelberg JF., Read TD., Dodson RJ., Umayam L., Brinkac LM., Beanan MJ., Daugherty SC., Deboy RT., Durkin AS., Kolonay JF., Madupu R., Nelson WC., Ayodeji B., Kraul M., Shetty J., Malek J., Van Aken SE., Riedmuller S., Tettelin H., W. O. Gill SR., Salzberg SL., Hoover DL., Lindler LE., Halling SM., Boyle SM. and Fraser CM. "The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002. 99(20), 13148-13153."

Pinna G. " Analyse des mécanismes d'action de composés inhibiteurs de l'expression de cytokines inflammatoires. Identification de composés d'intérêt thérapeutique. Thèse ULP Strasbourg I, 2003."

Poester F., Samartino L., Santos R. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties*, 2013, 32, 105-115."

Q

Qi W., Nong G., Preston JF., Ben-Ami F. and Ebert D. "Comparative metagenomics of *Daphnia* symbionts. *BMC Genomics.* 2009.10, 172."

Queipo-Ortuño MI., Colmenero JD., Bermudez P., Bravo MJ. and Morata P. "Rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis using a multiplex real-time PCR assay. *PLoS One.* 2009. 4(2), e4526. Erratum in: *PLoS ONE.* 4(2)."

Queipo-Ortuño MI., Colmenero JD., Reguera JM., García-Ordoñez MA., Pachón ME., Gonzalez M. and Morata P. "Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005 11(9), 713-718."

Queipo-Ortuño MI., Colmenero JD., Reguera JM., García-Ordoñez MA., Pachón ME., Gonzalez M. and Morata P. " Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005.11(9), 713-718."

Queipo-Ortuño MI., Morata P., Ocon P., Manchado P. and Colmenero JD. "Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1997. 35, 2927–2930."

Rabinovitch M. "(1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell. Biol.* 5(3), 85-87."

R

Rajashekara G., Covert J., Petersen E., Eskra L. and Splitter G. " Genomic island 2 of *Brucella melitensis* is a major virulence determinant: functional analyses of genomic islands. *J. Bacteriol.* 2008. 190(18), 6243-6252."

Rajashekara G., Eskra L., Mathison A., Petersen E., Yu Q., Harms J. and Splitter G. "Brucella: functional genomics and host-pathogen interactions. *Anim. Health Res. Rev.* 2006.7(1-2) 1-11. Review."

Rajashekara G., Glasner JD., Glover DA. and and Spitter GA. "Comparative wholegenome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *Journal of Bacteriology.* 2004.186, 5040–5041."

Rasool O., Freer E., Moreno E and Jarstrand C. " (1992) Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect. Immun.* 1992. 60(4), 1699-1702."

Refai M. " (2002) Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet. Microbiol Review.* 90(1-4), 81-110."

Relevé Epidémiologique Mensuel. Institut National de Santé Publique. <http://www.ands.dz/insp/insp-publicat.html> "

Roth F et al. "Human health benefits from livestock vaccination for brucellosis : case study. *Bulletin of the World Health Organization* 2003, 81."

Roux J. " *Brucella* in LE MINOR L & VERON M. *Bactériologie Médicale.* Flammarion, Paris, édition 1989, p. 651-670."

Russo G., Pasquali P., Nenova R. and et al. "Reemergence of human and animal brucellosis, Bulgaria. *Emerg Infect Dis* 2009 ; 15 : 314–6."

S

Scholz HC., Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F., Kämpfer P., Neubauer H., Cloeckeaert A., Marquart M., Zygmunt MS., Whatmore AM., Falsen E., Bahn P., Göllner C., Pfeffer M., Huber B., Busse HJ. and Nöckler K. "Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. 58, 375-382."

Seco-Mediavilla P., Verger JM., Grayon M., Cloeckeaert A., Marín CM., Zygmunt MS., Fernández-Lago L. and Vizcaíno N. " Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.*2003. 10(4), 47-51."

Seleem MN., Boyle SM. and Sriranganathan N. " (2010) Brucellose: une zoonose réémergente . *Vet Microbiol* 140 : 392-398."

Sergent, E. "(1908), "La fièvre méditerranéenne en Algérie: note préliminaire". *Bull. Soc. Path. Exot., T.I, N°1*, In "Recherches expérimentales sur la pathologie algérienne (microbiologie-parasitologie) 1902-1909", (éd Sergent, E.), 235-265."

Sfaksi, A. ""La brucellose ovine et caprine dans la wilaya de Constantine", mémoire de docteur vétérinaire, Constantine (1979-1980)."

Skendros, P. et Boura, P. Immunity to brucellosis. *Revue scientifique et technique de OIE.*2013, Vol. 32, pp. 137-147

Sohn Ah., Probert WS., G. CA. and et al. "Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg.Infect.Dis* 2003;9(4):485-8."

Sola-Landa A., Pizarro-Cerdá J., Grilló MJ., Moreno E., Moriyón I., Blasco JM., Gorvel JP. and López-Goñi I. "(1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol.* 29(1), 125-138."

Starr T., Ng TW., Wehrly TD., Knodler LA. and Celli J. "Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic.* 2008.9(5), 678-694."

Stow, J. L., A. P. Manderson and R. Z. Murray "SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2006. 6, p. 919-929."

T

Tabatabai LB., Deyoe BL. and Ritchie AE. " Isolation and characterization of toxic fractions from *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*1979.26(2), 668-679."

Tabet- Derraz NF., Bestaoui S. and et al. " Epidémiologie et clinique de la brucellose humaine sur trois décennies en zone endémique . 13eme journée nationales d'infectiologie, 2011, p5."

Teyssier C., Marchandin H. and et Jumas-Bilak E. "Le génome des alphaprotéobactéries: complexité, réduction, diversité et fluidité. *Can. J. Microbiol.* 2004.50, 383–396."

Thakur SD., T. Kumar R. and Thapliyal DC. "Human brucellosis : review of an under-diagnosed animal transmitted disease. *J.Commun. Dis* 2002;34(4):287-301."

V

Velasco J., Bengoechea JA., Brandenburg K., Lindner B., Seydel U., González D, Zähringer U., Moreno E. and Moriyón I. "Brucella abortus and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect. Immun.* 2000. 68(6), 3210-3218. 30Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005. 8, 60-66."

Verger JM., Grimont F., Grimont PAD. and et Grayon M. " Brucella, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacterio.*1985.1. 35, 292 295."

Vizcaíno N., Caro-Hernández P., Cloeckaert A. and Fernández-Lago L. "DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-k inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes Infect.* 2004.6(9), 821-834."

Vizcaino N., Cloeckaert A., Zygmunt MS. and Dubray G. "Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect. Immun.*1996.64, 3744–3751."

Vizcaino N., Cloeckeaert A., Zygmunt MS. and Fernandez-Lago L. "Molecular characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *B. abortus* strains: evidence for a locus involved in the synthesis of a polysaccharide. *Infect. Immun.* 1999.67,2700–2712."

W

Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich " Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and Differentiation.* 2003. 10, p. 45-65."

Woese CR., Stackebrandt E., Macke TJ. and Fox GE. "A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa.. *Syst. Appl. Microbiol.* 1985 . 6, 143-151."

Y

Yanagi M. and Yamasato K. " Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993. 107, 115–120."

Young EJ. and et Corbel MJ. "(1989) *Brucellosis: clinical and laboratory aspects.* pp. 192."

YIFAN ZHAN, ZHANQI LIU , AND CHRISTINA CHEERS Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-12 Contribute to Resistance to the Intracellular Bacterium *Brucella abortus* by Different Mechanisms Department of Microbiology, University of Melbourne, Australia *INFECTION AND IMMUNITY*, July 1996, p. 2782–2786 Vol. 64, No. 7

Z

Zhande, R., S. M. Dauphinee, J. A. Thomas, M. Yamamoto, S. Akira and e. al. " FADD negatively . regulates lipopolysaccharide signaling by impairing interleukin 1 receptor associated kinase 1 MyD88 interaction. *Molecular and cellular biology.* 2007. 27, p. 7394-7404." Innis, M.A., and Gelfand, D.H. (1994). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.* London: CRC Press, pp. 5 11.

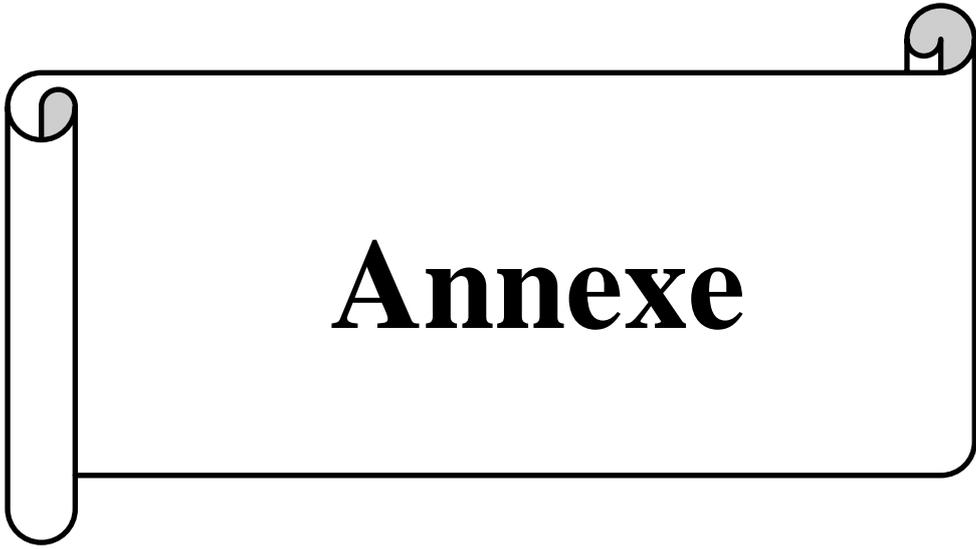
SITE WEB

"<http://emedecine.com>."

"[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3b/TNFa Crystal Structure.rsh.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3b/TNFa_Crystal_Structure.rsh.png)."

"<http://www.ands.dz/insp/insp-publicat.html>"

"<http://www.invs.sante.fr/surveillance/brucellose/default.htm> "



Annexe

Annexe 1

Fiche d'enquête**1 /Identification du patient :**

Nom :

Prénom :

Sexe : Féminin Masculin

Age :

Profession :

Etat marital : célibataire Marié(é) Divorcé(é)

Tel : Adresse :

Ville (village) :

Identification du cas : malade témoin **2/Contexte épidémiologie :**Profession exposé : Oui Non ingestion du produits laitiers crus : Oui Non Cas similaires dans l'entourage : Oui Non Zone endémique : Oui Non **3/Tableau clinique, traitement :**F .asymptomatique : Oui Non

Signes cliniques :

Fièvre : Oui Non Sueurs : Oui Non Algies : Oui Non

Douleurs : Oui Non

Autres signes : Oui Non

Traitement :

Antibiotiques : Oui Non

Autre : Oui Non

4/Biologie:

FNS : leucocytose neutrophile

Leuconeutropénie

Rose Bengale : Positif Négatif

Saw : Positif Négatif

5/Radiologie :

TDM=

IRM=

6/Profil génétique :

Résultats attendus :

Gènes déterminés :

Annexe 2

Préparation des solutions:

Préparation de 1L de TE 10/10 :

- 10ml tris-Hcl (1M, PH=8)
- 20ml EDTA (0.5M, PH=8)

Préparation de 1L de TE 10/1 :

- 10ml tris-Hcl (1M, PH=8)
- 2 ml EDTA (0.5M, PH=8)
- qsp eau distillé.

Préparation de la solution de lyse (100ml) :

- 1ml tris-Hcl (1M, PH=8)
- 20ml EDTA (0.5M, PH=8)
- 5ml SDS (10%)
- qsp eau distillé.

Préparation de NaCl (5M) :

Pour 5M : 292,25 g ----- 1000ml eau distillée.

Préparation d'EDTA (0.5M, PH=8) :

Fait dissoudre 93,06 g de EDTA dans 400ml d'eau distillée puis ajuste jusqu'au 500ml, et avec du NaOH (5M) règle le Ph a 8

Préparation de TRIS Hcl (pH=8) :

121 ,14 g pour 1L

Equilibrer avec Hcl pour pH=8

التلخيص

مقدمة: الحمى المالطية، وهو مرض معد الماشية، والمعروفة باسم حمى مالطا. وهي أمراض بشرية حيوانية المنشأ، التي تسببها البكتيريا من جنس البروسيلا. امتداده عالمي، مع غلبة في حوض البحر الأبيض المتوسط والبلدان النامية، حيث لا يزال يشكل مشكلة صحية عامة خطيرة، ويمثل تكلفة اقتصادية كبيرة. الوقاية من المرض الأساسي، وذلك نظرا للمخاطر على صحة الإنسان وتأثير اقتصادي كبير.

الغرض: البناء من البنك الحيوي الحمض النووي عن طريق استخراج الحمض النووي من الدم التي تم جمعها من المرضى الذين يعانون من مرض البر وسيلا و أشخاص مقاومين ، وكذلك تصميم الاشعال المرافقة الجين -TNF ألفا.

المواد والطرق: تم أخذ 21 عينات بما في ذلك أشخاص مقاومين للمرض 8 شخص و 13 مريضا في قسم الأمراض المعدية في مستشفى جامعة تلمسان. ويتم استخراج الحمض النووي مع الفين كلوريد الصوديوم. ويعاير تركيزات هذه الاحماض النووي طيفيا في 260 نانومتر و 280 نانومتر. تم تصميم الاشعال محددة المرافقة الجين -TNF ألفا من أداة التمهيدي Blast .

النتائج: يتم استخراج ما مجموعه 13 حمض نووي من المرضى، و 8 حمض نووي من أفراد المقاومة. أظهرت جرعة من الحمض النووي 21 حمض نووي ملوثة ببيروتينات.

كلمات البحث: الحمى المتموجة، حمض نووي ، الاشعال، الجينات -TNF ألفا، والمرضى المقاومين ، تلمسان

Résumé

Introduction : La brucellose, maladie contagieuse des animaux d'élevage, connue sous le nom de fièvre de Malte ou mélitococcie. C'est une anthrozoonose, due à des bactéries du genre Brucella. Son extension est mondiale, avec une prédominance dans le pourtour du bassin méditerranéen et les pays en voie de développement, où elle pose encore un véritable problème de santé publique, et représente un surcoût économique important. La prévention de la maladie est essentielle, compte tenu de son risque pour la santé humaine et son impact économique important.

Objectif : Construction d'une biothèque d'ADN par extraction d'ADN à partir du sang prélevé chez des patients atteints de la maladie de brucellose et les résistants et aussi une conception d'amorces encadrant le gène TNF alpha.

Matériels et méthodes : 21 prélèvements ont été effectués, dont 8 résistants et 13 malades, au niveau du service des maladies infectieuses du CHU de Tlemcen. L'extraction de l'ADN est réalisée grâce à la technique NaCl. Les concentrations de ces ADN ont été dosés par spectrophotométrie à 260nm et à 280 nm. Des amorces spécifiques encadrant le gène TNF alpha sont conçues par l'outil Primer –Blast.

Résultats : Un total de 13 ADN est extrait des patients, et 8 ADN des sujets résistants. Le dosage de ces ADN a montré 21 ADN contaminés spécifiquement par les protéines.

Mots clés : Brucellose, ADN, amorces, gène TNF alpha, patients, résistants, Tlemcen

Abstract

Introduction: Brucellosis, a contagious disease of livestock, known as Maltese fever or melitococcus. It is an anthrozoonosis, due to bacteria of the genus Brucella. Its extension is global, with a predominance in the Mediterranean basin and the developing countries, where it still poses a real public health problem, and represents a significant economic cost. Prevention of the disease is essential, given its risk to human health and its significant economic impact.

Objective: Construction of a DNA library by DNA extraction from blood taken from patients with brucellosis disease and resistant and also a design of primers framing the TNF alpha gene.

Materials and methods: 21 samples taken, including 8 resistant and 13 patients, in the department of infectious diseases of the Tlemcen University Hospital. The extraction of the DNA is carried out using the NaCl technique. These DNAs are assayed by spectrophotometry at 260 nm and 280 nm. Specific primers surrounding the TNF alpha gene are designed by the Primer-Blast tool.

Results: A total of 13 DNA is extracted from patients, and 8 DNA from resistant subjects. The dosage of these DNAs showed 21 DNAs specifically contaminated by proteins.

Key words: Brucellosis, DNA, primers, TNF alpha gene, patients, resistant, Tlemcen.