

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat

Faculté des Sciences

Département de Biologie



جامعة عمار تليجي - الأغواط

كلية العلوم

قسم البيولوجيا

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en biologie

Option : génie biologique

## Thème

Etude de l'opportunité de l'introduction du test de dépistage de la brucellose

Lors du contrôle du sang des donneurs dans la région de Laghouat

Présenté par :

• BENDJEDAIA KHAOULA

Co-Encadré par:

• KRANTAR KAMEL

Juin 2012

## **Résumé : Etude de l'opportunité de l'introduction de dépistage de la brucellose lors du contrôle du sang des donneuses dans la Wilaya de Laghouat**

La transfusion sanguine est un moyen important de thérapie; cependant elle fait courir au receveur beaucoup de risque tels que les contaminations par les maladies infectieuses et puisque il ya quatre paramètres systématiques lors du contrôle du sang des donneurs et qui sont hépatite B et C, sida et syphilis . A cet effet nous nous sommes rapprochés du CTS de l'hôpital de Laghouat Ahmida Ben Adjila afin de contrôler un cinquième paramètre dans le sang des 159 donneurs qui est la brucellose. Cela nous a permis de dépister dix (10) cas positifs de brucellose par le test de rose Bengale, huit (8) cas séropositifs par le séro-diagnostique de Wright et sept (7) cas séropositifs par la méthode de fixation du complément. Le présent bilan signifie une séroprévalence de 6,23% de la brucellose et pour ce taux élevé il est recommandé d'introduire le test de dépistage de brucellose systématiquement lors du contrôle du sang des donneurs pour minimiser au maximum le risque danger pour la santé de receveur de sang.

**Mots clés:** La transfusion sanguine, dépistage, brucellose, Laghouat.

## **Abstract: study of the opportunity of the introduction of the detection of the brucellosis during the control of the blood donors in Laghouat. region.**

Blood transfusion is an important means of therapy, but it puts a lot of risk to the recipient such as contamination by infectious diseases and because there are four parameters when systematic testing of blood donors who are hepatitis B and C, AIDS and syphilis which imposes the risk of contamination by other infections that are not systematically monitored. To this end we approached the CTS Laghouat hospital Ahmida Ben Adjila to control the fifth parameter in the blood of 159 donors which is brucellosis. This allowed us to detect ten (10) positive cases of brucellosis by the Rose Bengal test, eight (8) positive cases by the Wright serodiagnostic and seven (7) positive cases by the method of complement fixation. This means a balance of 6.23% sero-prevalence of brucellosis and therefore it is recommended to introduce the screening test for brucellosis during the systematic screening of blood donors to minimize the maximum degree of health hazard of blood recipient.

**Key words:** Blood transfusion, brucellosis, detection, Laghouat

**ملخص: دراسة الجدوى من ادخال اختبار الحمى المالطية اثناء اجراء الفحص الروتيني لدم المتبرعين بمنطقة**

**الأغواط**

يعتبر نقل الدم وسيلة هامة للعلاج التي يمكن أن تنقل للمتلقي الكثير من المخاطر مثل الأمراض المعدية. يتم البحث فقط على أربعة اختبارات عند اجراء الاختبار المنهجي للمتبرعين بالدم و التي تتمثل في الكشف عن الأجسام المضادة لالتهاب الكبد B، التهاب الكبد C فيروس نقص المناعة البشرية (الإيدز) والمضادة لمرض الزهري. وبالإضافة إلى ذلك، عوامل أخرى معدية قد تفلت من الكشف أثناء الاختبارات الروتينية بما في ذلك البروسيليا. تحقيقا لهذه الغاية اقترحنا من مركز نقل الدم في مستشفى احمد بن عجيل لدراسة مدى انتشار الحمى المالطية بين المتبرعين بالدم في منطقة الأغواط. تم دراسة اختبار الحمى المالطية ل 159 عينة. من بين هذه العينات، وعشرة (10) حالات ايجابية بعد إجراء اختبار rose bengale ، ثمانية (8) حالات ايجابية بطريقة séro-diagnostique de Wrgiht وسبع (7) حالات ايجابية بطريقة Fixation du complément . وهذا يعني انتشار مصلي بنسبة 6.23% من الحمى المالطية و تعتبر نسبة عالية. فمن المستحسن أن يدمج اختبار الكشف عن الحمى المتزوج خلال الفحص المنتظم للتبرع بالدم للحد من درجة المخاطر الصحية لمتلق الدم.

**كلمات المفتاح :** نقل الدم , البروسيليا, اختبار, الأغواط .

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail:*

*A ma source de bonheur, mes chers parents école de ma tendre enfance pour l'amour et tous les sacrifices qu'ils ont consenti pour moi et surtout merci de m'avoir soutenus. Que Dieu les protège.*

*A mes chers grands Pères et mes Grandes mères*

*A mon deuxième père oncle ABDELFIMANE*

*A mes très chers frères: NADHIR, BACHIR, et mon petit chou LAKHDAR,*

*A mon adorable sœur SELMA, a ma petite fille BOUCHERA et a ma poupée MADJEDA*

*A ma chère cousine amie IMANE merci d'avoir été toujours là*

*A ma chère voisine sœur ZOHRÀ*

*A tous mes oncles paternels: ALI, HOUCINE, DJELOUL et ABDELMALEK*

*A mon seul chère oncle maternel BACHIR,*

*A toutes mes tentes sans exception surtout SOUAD, DJIHAD, AMINA et NAÏMA*

*A ma chère seule tente paternel MESOUDA*

*A mes chères amies: BEDRINA MERJEM, DJAAMAT FATIMA ZOHRÀ et BOUAYCHA MERJEM votre amitié est un véritable don de Dieu*

*A tous mes cousins et cousines surtout KHADIDJA et MERJEM*

*A toute la famille BENDJEDAIA et HARANNE*

*A mon chère collègue d'étude SALAH*

*A toute ma promotion de Génie-biologique 2011-2012*

*BENDJEDAIA KHAOULA*

## **Remerciements**

*Au terme de ce modeste travail, je tien à adresser mes plus vifs remerciements et mon gratitude a mes promoteurs monsieur KRANTAR KAMLE, enseignant au département de Biologie ,université de Laghouat, le Docteur BENHAOUCHE LARBI, medecin a l'hôpital de Laghouat au service de CTS et a monsieur HAMEL KHALED chef de service au CTS de Laghouat pour leur patience ,disponibilité et aide inestimable. Mes promoteurs méritent la palme de ce travail.*

*Je tien à exprimer mes sentiments les plus solennels de gratitude et de reconnaissance aux membres de jury qui ont accepté d'évaluer mon travail*

*Je tiens a exprimer aussi mes mes sentiments les plus solennels de gratitude et de reconnaissance au Monsieur Becheur Mourad pour son aide et disponibilité.*

*Je rend un grand hommage à tous les enseignants qui ont participé de près ou de loin a ma formation durant les cinq ans d'étude .*

*Mes gratitudes irons également au personnels du laboratoire du CTS de Laghouat et enfin je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'elaboration de ce modeste travail.*

*BENDJEDAJA KHAOUJA*

Résumé	
Dédicace.....	I
Remerciement.....	II
Sommaire.....	III
Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des abréviations.....	IX
Introduction.....	01
<b>Chapitre I:le sang et la transfusion sanguine</b>	
I.1	Le sang..... 03
I-1-1	Caractères généraux..... 03
I-1-2	Composition du sang..... 03
I.1.3	Rôle du sang..... 05
I-1-4	Les groupes sanguins..... 06
I.2	La transfusion sanguine..... 06
I.2.1	Les donneurs du sang..... 07
I.2.2	Procédé de séparation..... 08
I.2.3	Risque et complications..... 13
<b>Chapitre II: les paramètres systématiques</b>	
II.1.	Virus de l'hépatite B (VHB)..... 14
II.1.1.	Généralités ..... 14
II.1.2	Manifestations cliniques de l'infection par le VHB..... 15
II.1.3	Mode de transmission..... 16
II.2	Virus de l'hépatite C (VHC)..... 16
II.2.1	Généralités..... 16
II.2.2	Aspects cliniques de l'infection par le VHC..... 17
II.2.3	Mode de transmission ..... 18
II.3.	Virus de l'immunodéficience humaine: HIV..... 18
II.3.1	Généralités..... 18
II.3.2	Réponse immunitaire à l'infection par le HIV..... 25
II.3.3	Mode de transmission..... 20
II.4	Tests de dépistage de l'hépatite VHB/HCV/ HIV..... 20
II.4.1	Les tests Immuno-Enzymatiques..... 20

II.4.2	Le test rapide.....	22
II.5.	La syphilis.....	22
II.5.1	Généralités.....	22
II.5.2	Pouvoir pathogène.....	23
II.5.3	Diagnostiques biologiques.....	23
<b>Chapitre III: la brucellose</b>		
III. 1	Généralités.....	25
III.1.1	Classification.....	25
III.1.2	Caractères biochimiques.....	26
III.1.3	Caractères antigénique.....	27
III.2.	Répartition géographique du genre <i>Brucella</i> .....	29
III.11.1	Au niveau du Maghreb.....	30
III.11.2	Au niveau national.....	30
III.3	Fréquence chez l'homme.....	30
III.3.1	Au niveau mondial.....	30
III.3.2	Au niveau national.....	31
III.4.	Reservoir.....	32
III.4.1	animale.....	32
III.4.2.	Homme.....	33
III.5	Transmission.....	33
III.5.1	Animale .....	34
III.5.2	Chez l'homme .....	34
III.6	Resistance.....	36
III.6.1	Resistance Aux Agents Physiques.....	36
III.6.2	Resistance Aux Agents Chimiques.....	37
III.6.3	Action Des Antibiotiques.....	37
III.7.	Les symptômes et les lésions.....	37
III.7.1	Symptômes et lésions de l'appareil génital.....	38
III.7.2	Symptômes et lésions extra génital.....	39
<b>Chapitre IV:les tests de dépistage de la brucellose</b>		
IV.1	Sérodiagnostic de Wright (séro-agglutination en tube).....	40
IV.2	Test de rose Bengale : Epreuve à l'antigène tamponné (E.A.T) (Card-test) ..	41
IV.3	Réaction de fixation du complément.....	42

IV.4	Technique d'Elisa (Enzyme linked immunosorbant Assay).....	45
<b>Partie expérimentale (Matériels et méthodes)</b>		
I.	Objectifs.....	46
II	Matériels et méthodes.....	46
II.1	Matériels.....	47
II.2	Méthodes.....	47
<b>Partie expérimentale (Resultats et discussions)</b>		
I.	Résultats.....	58
II.	Discussion.....	61
	Conclusion.....	63
	Références bibliographiques.....	65
	Annexe.....	69

**Liste des tableaux:**

<b>Tableau</b>	<b>1</b>	Caractères différentiels des différentes espèces de Brucella	<b>26</b>
<b>Tableau</b>	<b>2</b>	fréquence de brucellose au niveau mondiale .	<b>31</b>
<b>Tableau</b>	<b>3</b>	Répartition de la brucellose humaine dans les wilayas de l'Algerie connues endémiques de 1992 à 2000 .	<b>32</b>
<b>Tableau</b>	<b>4</b>	seuil de positivité du test de Wright.	<b>41</b>
<b>Tableau</b>	<b>5</b>	Le seuil de positivité de test de fixation de complément	<b>44</b>
<b>Tableau</b>	<b>6</b>	Répartition de l'échantillon selon le sexe, l'âge et le groupe sanguin.	<b>46</b>
<b>Tableau</b>	<b>7</b>	Résultats du contrôle sérologique.	<b>58</b>
<b>Tableau</b>	<b>8</b>	Résultats de test de dépistage de brucellose	<b>61</b>

<b>Figure 1</b>	Etapas de séparation du sang en dirivés sanguins labiles par centrifugation	<b>08</b>
<b>Figure 2</b>	centrifugeuse des poches du sang	<b>09</b>
<b>Figure 3</b>	L'aspect d'une poche placée dans le bac de la centrifugeuse	<b>09</b>
<b>Figure 4</b>	L'aspect d'une poche de culot globulaire et sa conservation	<b>10</b>
<b>Figure 5</b>	L'appareil de séparation de plasma	<b>11</b>
<b>Figure 6</b>	Séparation de plasma	<b>11</b>
<b>Figure 7</b>	Congélation de plasma	<b>12</b>
<b>Figure 8</b>	L'appareil d'un système d'agitation continu pour la conservation des plaquettes	<b>12</b>
<b>Figure 9</b>	Structure de virus HBV	<b>15</b>
<b>Figure 10</b>	. La structure de virus de HCV	<b>17</b>
<b>Figure 11</b>	Structure de virus de HIV.	<b>19</b>
<b>Figure 12</b>	Répartition géographiques des espèces causales	<b>29</b>
<b>Figure 13</b>	Les différentes voies de transmission de la brucellose animale et humaine.	<b>33</b>
<b>Figure 14</b>	La transmission par voie cutanée.	<b>34</b>
<b>Figure 15</b>	La transmission par voie déjестive.	<b>35</b>
<b>Figure 16</b>	Transmission par inhalation	<b>36</b>
<b>Figure 17</b>	L'action des antibiotiques sur la <i>Brucella</i>	<b>37</b>
<b>Figure 18</b>	Le principe de test de sérodiagnostique de Wright	<b>41</b>
<b>Figure 19</b>	Le témoin négatif et temoins positif de test de rose bengale	<b>42</b>
<b>Figure 20</b>	Le principe de test de fixation du complément	<b>43</b>
<b>Figure 21</b>	Lecture du test de fixation du complément	<b>44</b>
<b>Figure 22</b>	Photo représente la microplaque contient des cupules traitrés	<b>50</b>
<b>Figure 23</b>	Le lecteur de microplaque et l'imprimante du lecteur	<b>51</b>
<b>Figure 24/a</b>	L'emballage des bandelettes.	<b>54</b>
<b>Figure 24/b</b>	La bandelette et son diluant.	<b>54</b>
<b>Figure 25</b>	Dépôt de goutte de sérum dans la bandelette.	<b>54</b>

<b>Figure 26</b>	Le test de rose Bengale	<b>55</b>
<b>Figure 27</b>	L'aspect de positivité de test rapide(les bandelettes)	<b>59</b>
<b>Figure 28</b>	Résultats de test de fixation du complément	<b>59</b>

**Liste des abréviations:**

- Ac:** Anticorps
- ADN:** Acide Désoxyribose Nucléique
- ANS :** Agence National du sang
- CTS:** Centre de Transfusion Sanguine
- DO:** Densité Optique
- DSA:** Direction des services agricoles
- EAT:** Epreuve d'Antigène Tamponné
- ELISA:** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- FAO:** Food and Agriculture Organization
- FC:** Fixation du complement
- FTA:** Fluorescent Treponemal Antibody
- GB:** Globule blanc
- GR:** Globule rouge
- H:** Heure
- HBc:** Hépatite B (l'antigène de corps)
- HBs:** Hépatite B (l'antigène de surface)
- HBV:** Hépatite B virus
- HCV:** Hépatite C virus
- HIV:** Humain Immunodéficience Virus
- HTLV:** Humain T Lymphotropic Virus
- Ig:** Immunoglobuline
- LDL:** Low Density lipoprotein

<b>LPS:</b>	Lipopolysaccharide
<b>O.A.P</b>	Œdème Aigu du Poumon
<b>p.100:</b>	pour 100 (%)
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PD:</b>	pendant
<b>PTS:</b>	Poste de Transfusion Sanguine
<b>RB:</b>	Rose Bengale
<b>RE:</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>Rh:</b>	Rhésus
<b>S:</b>	Smooth
<b>SAW:</b>	Sérodiagnostique de Wright
<b>T.V:</b>	Tampon véronal
<b>TPHA:</b>	Tréponéma Pallidum Heamagglutination Assay
<b>UCEES:</b>	Unité Communauté Economique Européenne Sensibilisatrice
<b>UI:</b>	Unité Internationale
<b>VDRL:</b>	Venereal Disease Research Laboratory
<b>VHB:</b>	Virus de l'Hépatite B
<b>VHC:</b>	Virus de l'Hépatite C

**Introduction:**

Le sang dans le cadre de la santé est un produit assimilé à un médicament dont il faut assurer la disponibilité, la sécurité et la qualité. En Algérie, la transfusion sanguine relève du service public.

La création de l'Agence National du sang par décret exécutif (Décret n°95-108 du 09/04/95) (A.N.S, 2002) traduit l'officialisation de l'engagement et du soutien de l'Etat au programme national du sang.

Les structures de transfusion sanguine créées ou régularisées par l'arrêt ministériel du 09 Novembre 1998 (A.N.S, 2002) assurent quatre activités principales: recrutement des donneurs et collecte de sang, qualification biologique ou examen des dons (détermination des groupes sanguins et recherche d'agents infectieux), préparation des produits sanguins et conservation et distribution des produits sanguins.

C'est ainsi que la transfusion sanguine a contribué à trois grands domaines thérapeutiques à savoir: traitements substitutifs en restitution aux malades des composants sanguins absents ou insuffisants, Immunothérapie passive en apportant aux malades d'anticorps spécifiques dont ils sont dépourvus et actes techniques et transfusionnels cas de chirurgie, rein artificiel et échange plasmatique.

Ces progrès techniques ont induit l'apparition dans les années 1990 du concept d'Hémovigilance. ce terme regroupe l'ensemble des procédures de surveillance organisées depuis la collecte du sang et ces composants jusqu'au suivi des receveurs en résultant de l'utilisation thérapeutique des produits sanguins labiles afin d'en prévenir l'apparition.

La qualification du don du sang en matière de dépistage désigne l'ensemble des opérations afférentes aux analyses biologiques pratiquées au laboratoire et qui permettent d'évaluer la sécurité du don vis-à-vis des maladies transmissibles par le sang et dont le dépistage est obligatoire.

L'objectif assigné est donc la sécurité transfusionnelle vis-à-vis du receveur et l'information du donneur en cas d'anomalie constatée.

A ce titre la qualification biologique du don comporte une première étape de dépistage suivie si nécessaire d'une seconde pour confirmation du résultat.

D'après l'article 1 de l'arrêté du 24 Mai 1998 la détection systématique des marqueurs de l'Agent infectieux porte en Algérie sur: la recherche de l'Ag HBs pour l'hépatite B, la recherche des anticorps anti HCV pour l'hépatite C, la recherche des anticorps anti HIV pour l'infection à HIV et la recherche des anticorps anti tréponimiques pour la syphilis.

Par contre dans les laboratoires des pays développés sont pratiqués en plus : la recherche de l'anticorps anti HBc de l'hépatite B, la recherche de l'anticorps anti HTL VI et II, le dosage des ALAT (Alanine Amino Transférase) pour la détection possible des hépatites en général et la recherche des agents pathogènes d'autres maladies (paludisme, brucellose.....).

Ce constat amène à la question suivante : est-ce que les analyses pratiquées aux centres de transfusion sanguine sont suffisantes pour dire qu'un sang est qualifié? En d'autres termes le receveur en Algérie est-il en sécurité vis-à-vis des maladies transmissibles par le sang lors d'une transfusion sanguine?

Pour cela on a proposé de contrôler un 5ème paramètre dans le sang des donneurs au centre de transfusion sanguine de Laghouat et notre choix s'est posé sur la maladie de brucellose pour plusieurs raisons premièrement l'agent pathogène de cette maladie est transmissible par le sang et deuxièmement parce que la région de Laghouat est un foyer de brucellose est donc c'est une région endémique de cette maladie surtout durant les mois de Mars, Avril et Mai vue la production élevée de lait et ses dérivés (petit lait, fromage frais.....) ainsi que la leur consommation de façon non contrôlé par les services concernés.

La question qui se pose c'est es qu'il est nécessaire de contrôler systématiquement le paramètre de brucellose lors du contrôle du sang des donneurs dans la région de Laghouat et dans ce travail on va essayer d'amener des éléments qui pourront nous aidés à répondre à cette question.

## **I.1. Le sang:**

### **I-1-1 Caractères généraux:**

Le sang est un organe mais sans limites fixes; c'est l'organe le plus volumineux dans l'organisme puisqu'il représente environ 5 Kg chez un adulte (Smaili, 2005).

Le sang est un tissu conjonctif il fournit l'un des moyens de communications entre les cellules de toutes les parties du corps et l'environnement externe (Waught et Grant, 2003), il est constitué des cellules en suspension dans un liquide( le plasma) qui constitue environ de 55% du volume sanguin et les cellules environ de 45% de celui-ci. Ces cellules de sang proviennent d'un petit nombre de cellules situées dans la moelle appelées cellules souches .

L'hématopoïèse peut être définie comme l'ensemble des phénomènes qui assurent la production continue des cellules sanguines, l'érythropoïèse pour les globules rouges, la granulopoïèse pour les granulocytes, la lymphopoïèse pour les lymphocytes et la thrombopoïèse ou megacaryocytopoïèse pour les plaquettes.

Le sang coagule dès qu'il est en contact avec une surface autre que l'endothélium vasculaire. La coagulation est l'ensemble des réactions enzymatiques dont le procédé de la conversion du fibrinogène est une protéase, la thrombine résultant de l'activation de la prothrombine plasmatique au terme d'une séquence de réaction enzymatique déclenchée in vitro par le contact du sang avec le verre et in vivo par un facteur tissulaire provenant apparemment de la tunique endothéliale lésée (Meyer, 1983).de façon à pouvoir étudier le sang in vitro, il est donc nécessaire de le prélever sur anticoagulant(Calas et *al.*, 1996).

### **I-1-2 Composition du sang:**

#### **➤ Plasma**

Les constituants du plasma sont l'eau (90 à 92 pour cent) et des substances dissoutes dont:

- des protéines: Albumine, globuline, fibrinogène, facteurs de coagulation.
- des sels inorganiques (sels minéraux).
- des nutriments provenant principalement d'aliments digérés
- des déchets organiques

- des hormones
- des enzymes par exemple certains facteurs de coagulation
- des gaz par exemple l'oxygène, le dioxyde de carbone, l'azote.

### ➤ **Les cellules du sang:**

Il existe trois types de cellules dans le sang les érythrocytes ou globules rouges (hématies), les leucocytes ou globules blancs et enfin les thrombocytes ou plaquettes (Waught et Grant 2003).

### ➤ **Les globules rouges ou les hématies:**

Découverts en 1658 par Swammerdam, les globules rouges sont les caractéristiques des vertébrés. Ils sont fabriqués au niveau de la moelle osseuse. Ce phénomène est appelé érythropoïèse (Sigogneau et Dassier 1996). Le globule rouge est une cellule dépourvue de noyau (anucléé) en forme de disque biconcave. Son diamètre longitudinal est de 8  $\mu\text{m}$ , son épaisseur en périphérie de 2.5  $\mu\text{m}$ , son épaisseur au centre est de 1  $\mu\text{m}$  (Herrera et Solal, 1985). Grâce à cette morphologie, les hématies sont très déformables ce qui leur permet de circuler dans des capillaires dont le diamètre peut être inférieur à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils sont dépourvus d'organites cytoplasmiques mais saturés d'hémoglobine qui est une chromoprotéine constituée d'une partie protéique,

La globine est formée de quatre chaînes polypeptidiques appariées deux à deux, la chaîne alpha comporte 141 résidus, les chaînes bêta, gamma et delta sont constituées par 146 résidus, la chaîne gamma présente la particularité d'être la seule chaîne d'hémoglobine à contenir l'isoleucine (Smaili, 1998). Sur chaque chaîne polypeptidique est fixée un hème responsable de la coloration rouge constituée d'une protoporphyrine et d'un atome de fer ferreux (Calas et *al.*, 1996).

### ➤ **Les globules blancs (leucocytes):**

Découverts par Hewson en 1770, les globules blancs sont des cellules nucléées dépourvues d'hémoglobine, formées dans les organes hématopoïétiques puis passent dans la circulation par diapédèse (Sigogneau et Dassier, 1996). Ils détruisent et éliminent tout agent pathogène étranger à l'organisme, ils représentent 40 à 70 pour cents des cellules circulantes (1600 à

7000 cellules par mm cube) (Smaili, 1998), ils sont présents dans le sang et dans les espaces interstitiels.

D'après Calas et *al.* (1998) on peut trouver sur un frottis sanguin coloré, selon les caractéristiques cytologiques 5 types de leucocytes:

- a- les granulocytes neutrophiles
- b- les granulocytes éosinophiles
- c- les granulocytes basophiles
- d- les lymphocytes
- e- les monocytes (Calas et *al.*, 1996).

### ➤ **Les plaquettes:**

Les plaquettes ou thrombocytes sont des fragments de cytoplasme émis dans la circulation par de très grandes cellules médullaires: les mégacaryocytes, les plaquettes sont de petits éléments de 2 à 4 µm de diamètre, de forme lenticulaire, anucléées. Elles jouent un rôle essentiel dans l'hémostase, mécanisme qui provoque l'arrêt d'un saignement (Calas et *al.*, 1996) et dans la protection des endothéliums vasculaires et un rôle dans l'inflammation puisqu'ils peuvent se dégranuler en présence des bactéries, de virus et de complexes AG-AC, elles libèrent des constituants augmentant la perméabilité capillaire et contribuent ainsi à la réaction inflammatoire, elles peuvent également phagocyter certaines particules (Sultan et *al.*, 1983).

### **I.1.3 Rôle du sang.**

Le sang représente: un volume contenu dans le système vasculaire et les cavités cardiaques. Ce volume est pratiquement constant pour un individu donné dans des conditions physiologiques normales. Il existe des échanges permanent entre le volume sanguin et les autres compartiments liquidiens de l'organisme, une réserve alimentaire et respiratoire, un moyen de transport qui entraîne les produits de l'activité cellulaire (CO<sub>2</sub>, bilirubine, urée, H<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et il transporte également les médicaments qui sont présents sous forme libre ou liés aux protéines et aux GR.

Par ailleurs le sang entre dans la régulation de l'équilibre acide-base, ceci par l'intermédiaire des systèmes tampons qu'il transporte. Il participe aussi à la thermorégulation en répartissant et en égalisant la chaleur dans le corps humain et il contient et transporte des substances indispensables au bon fonctionnement de l'organisme, ce sont les hormones, facteurs de l'hémostase, éléments immunitaires, enzymes et oligoéléments (Sigogneau et Dassier, 1996).

### **I-1-4 Les groupes sanguins :**

Sont un ensemble d'antigènes constitués en système génétiquement induits, chaque système de groupes sanguins est défini par ses antigènes et ses anticorps.

#### **➤ Le système ABO:**

Le système de groupe sanguin ABO se définit à la fois par la présence d'antigènes sur les hématies et par la présence d'anticorps dans le sérum. Le sujet a dans son sérum obligatoirement les anticorps dirigés contre les antigènes qui sont présents sur le globule rouge (Smaili, 2005)

Le système ABO classe les individus en 4 classes:

- Les sujets du groupe A qui possèdent l'antigène A et l'anticorps naturel anti B.
- Les sujets du groupe B qui possèdent l'antigène B et l'anticorps naturel anti A.
- Les sujets du groupe AB qui possèdent les antigènes A et B aucun anticorps.
- Les sujets du groupe O qui ne possèdent pas d'antigène mais des anticorps anti A et anti B

(Sigogneau et Dassier, 1996).

#### **➤ Le système Rhésus ou Rh :**

Il a été découvert en 1939 par Levine. Un individu qui ne possède pas l'antigène Rhésus dit aussi D ne doit recevoir que du sang Rh<sup>-</sup> ; afin d'éviter que les anticorps anti Rh ne se développent dans le sang du receveur et être à l'origine d'accidents graves lors de transfusions ultérieures (Sigogneau et Dassier, 1996).

### **I.2. La transfusion sanguine:**

La transfusion sanguine est une activité médicale unique basée sur l'administration intraveineuse de sang ou de dérivés sanguins d'un individu en bonne santé aux individus malades donc elle crée un lien directe et fort entre le sain et le pathologique (Lefrère et Rouger, 2000) elle apparaît après que Landsteiner eut découvert les groupes sanguins du système ABO (Genet et Mannoni, 1992).

Avant la seconde guerre mondiale, la transfusion sanguine était un geste spectaculaire reliant le donneur et le receveur d'abord bras à bras puis après la mise au point des solutions de conservation du sang à distance dans le temps et l'espace. Avec la seconde guerre mondiale la transfusion connaît un développement considérable.

#### **I.2.1 Les donneurs du sang:**

D'après l'ANS toutes personnes de 18 ans à 65 ans peut donner du sang à raison de 4 fois par an pour les hommes et 3 fois pour les femmes avec un intervalle minimale de 3 mois au minimum entre deux dons consécutifs. Le don du sang ne doit être soumis à aucune pression, n'appelle aucune rémunération et n'a aucune valeur marchande. Donc, il doit être volontaire et exclut tout commerce, gratuite du don l'anonymat du donneur pour le receveur et du receveur pour le donneur sont les autres principes éthiques fondamentaux du don du sang.

Le prélèvement du sang est toujours précédé d'un examen médicale du donneur comportant notamment un interrogatoire (Genet et Mannoni, 1992), visant à assurer la sécurité du donneur en évaluant son aptitude physiologique au don et la quantité de celui-ci (Habibi, 1990) puis chercher à déceler les symptômes et les comportements à risque conduisant selon les cas à une exclusion temporaire ou définitive du donneur du sang pour limiter le plus possible le nombre de dons prélevés pendant la fenêtre sérologique silencieuse (Waugh et Grant, 2003).

L'interrogatoire consiste à une série précise de questions qui permettra de s'assurer de l'état de santé du donneur en fonction de son passé récent et s'il s'agit d'un nouveau participant de son passé plus ancien. Le personnel médical doit être compétent et convaincu d'avoir à

L'examen médicale portera essentiellement sur la prise de tension artérielle et l'étude de pouls, la pression systolique ne doit pas être après un moment de repos inférieure à 10 et supérieure à 18 cm Hg, la pression diastolique ne doit pas être inférieure à 6 cmHg.

Le pouls doit être régulier bien frappé compris entre 52 et 90 pulsation par minute. L'examen cardiaque ne doit pas être exclue, il décèlera plus précisément des troubles du rythme voir un souffle (Genet et Mannoni, 1978).

### I.2.2 Procédé de séparation:

Avant de passer à la séparation du sang, un examen sérologique (HIV, HCV, HBs et TP) et le test d'agglutination (groupage sanguin) sont réalisés a partir d'un tube qui contient un anticoagulant ensuite la séparation se fait selon les étapes de la figure 1.

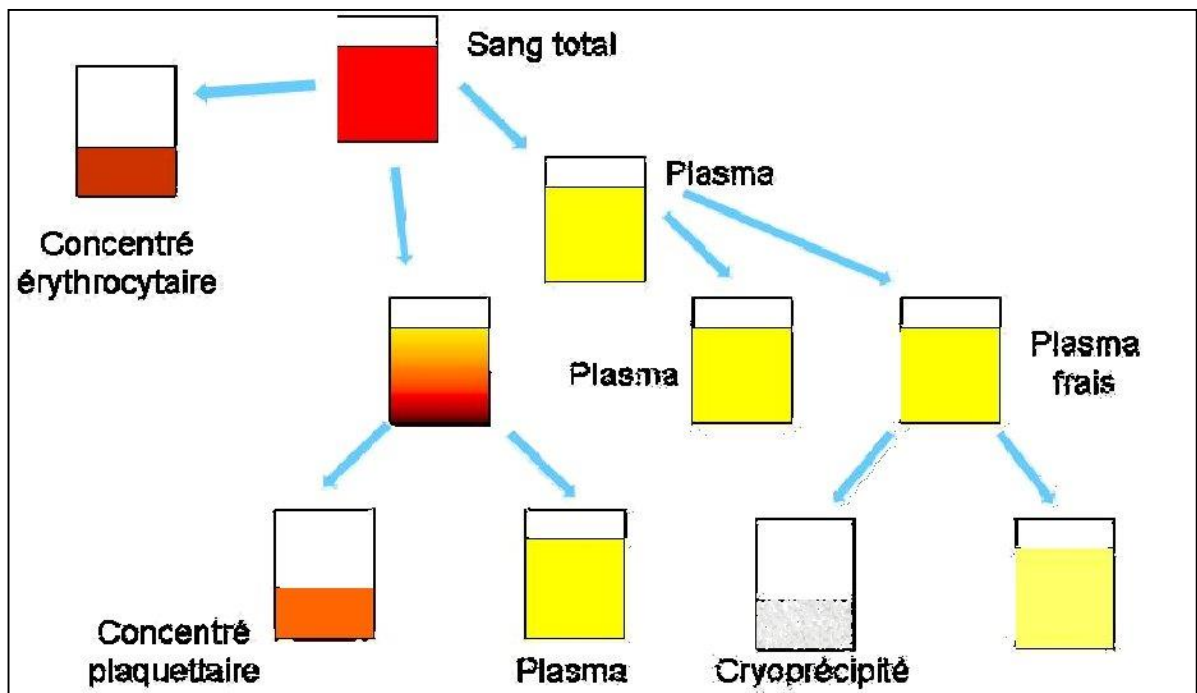
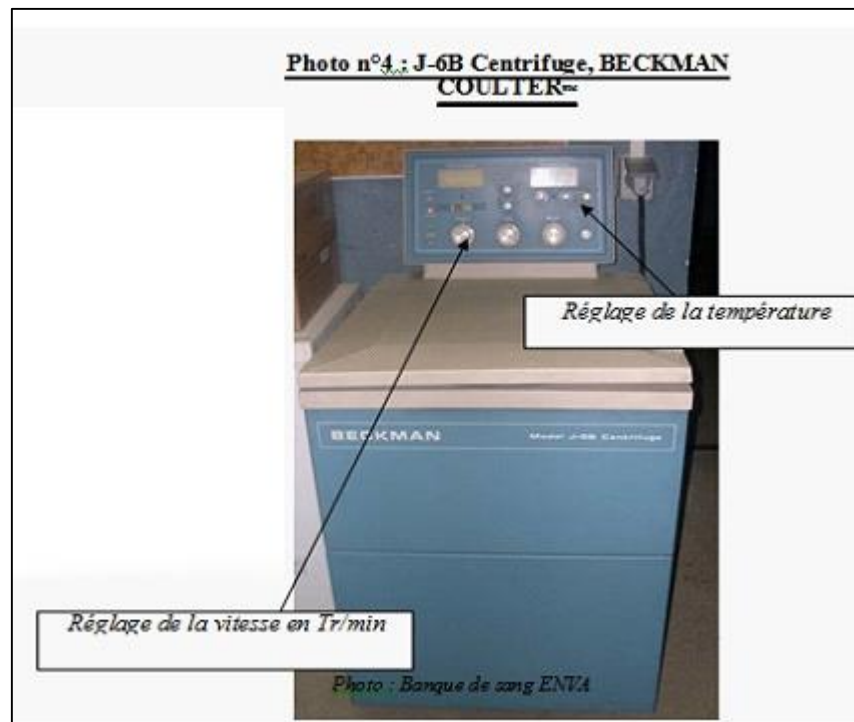


Figure 1: Etapes de séparation du sang en dérivés sanguins labiles par centrifugation.

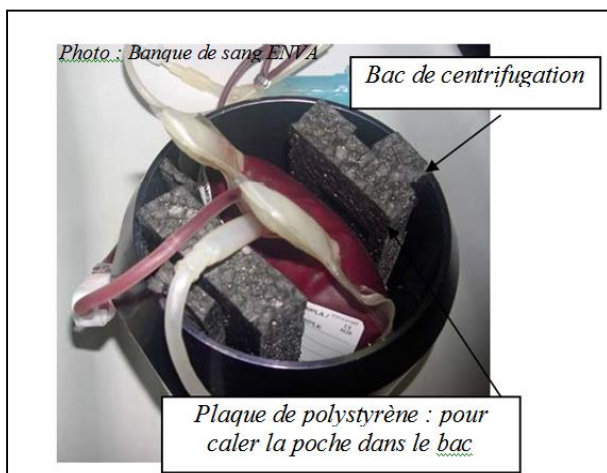
➤ **Concentré érythrocytaire et plasma:**

**a)-Concentré érythrocytaire**

Le concentré érythrocytaire correspond à une solution concentrée en globules rouges, mais pauvre en électrolytes et en facteurs de coagulation. On l'obtient par la centrifugation à froid (entre 1°C et 6°C) du sang total à 5000 tours/min pendant 5 minutes (**Fig. 2 et 3**).



**Figure 2:** La centrifugeuse des poches du sang (photo personnelle)



**Figure 3:** L'aspect d'une poche placée dans le bac de la centrifugeuse (photo personnelle).

Le concentré érythrocytaire correspond à la couche sédimentaire obtenue après centrifugation. Il est séparé du plasma, le surnageant, par une couche leuco-plaquettaire appelée « buffy coat ». Le plasma et le concentré érythrocytaire peuvent ensuite être séparés en deux poches distinctes (le « buffy coat » est généralement conservé avec le concentré érythrocytaire). Le concentré érythrocytaire est rouge sombre de manière relativement homogène. Le concentré érythrocytaire est ensuite stocké réfrigéré (1°C à 6°C) jusqu'à 42 jours (**Fig. 4**).



**Figure 4:** L'aspect d'une poche de culot globulaire et sa conservation (photo personnelle).

### b)-Le plasma :

Le plasma est une solution comprenant tous les facteurs de la coagulation ainsi que les différentes protéines sanguines circulantes. Il correspond à la fraction surnageante issue de la centrifugation à froid (entre 1°C et 6°C) du sang total à 5000 tours/min pendant 5 minutes. La procédure de séparation et la mise à température de stockage doit être effectuée dans les 6 heures suivant le prélèvement pour que le plasma obtenu ait la qualification de plasma frais. Si le procédé de centrifugation est effectué dans un délai supérieur à 6h après le prélèvement, le plasma est dépeleté en facteurs de coagulation labiles (facteurs V et VIII) et perd donc sa qualification de plasma frais pour devenir plasma. Celui-ci ne doit pas présenter de coloration rosée, signe d'hémolyse, et être de couleur jaune, relativement transparente. Le plasma et le plasma frais sont stockés congelés à -18°C à -30°C (fig.7)

La séparation du plasma et du concentré érythrocytaire est une technique simple permettant de couvrir la majeure partie des indications de transfusion en médecine vétérinaire et ces deux dérivés sont de stockage aisé (Fig. 5 et 6).

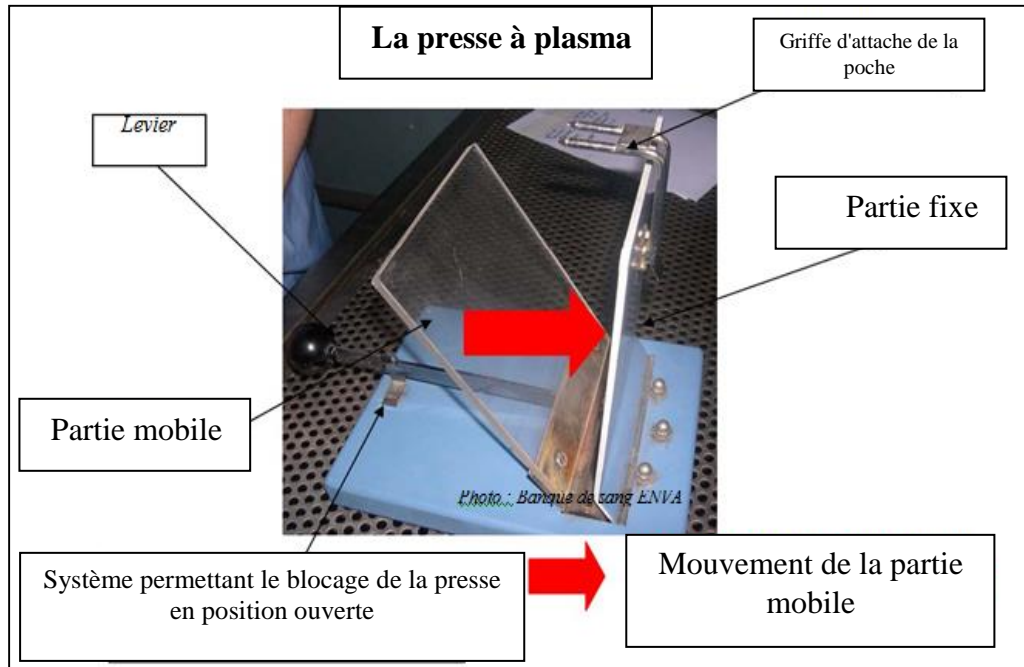


Figure 5: L'appareil de séparation de plasma (photo personnelle).

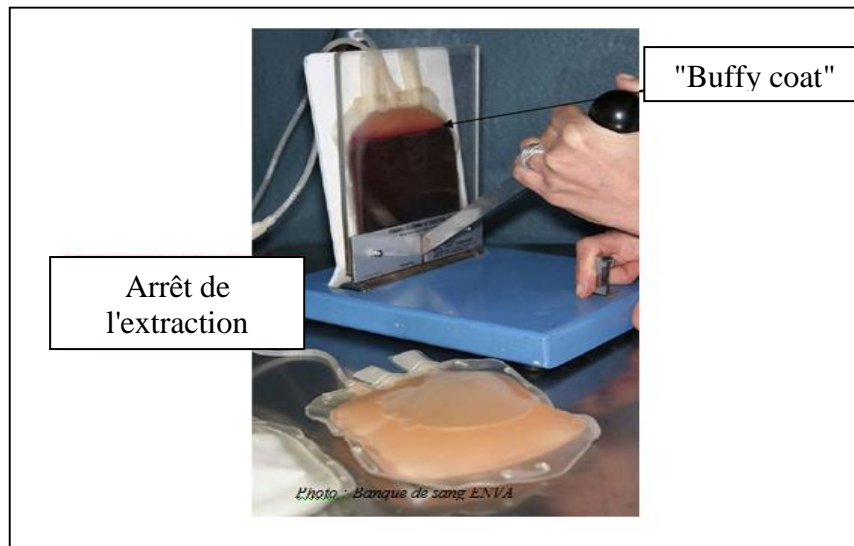


Figure 6: Séparation du plasma (photo personnelle)



**Figure 7:** Congélation de plasma (photo personnelle).

**c)-Plasma enrichi en plaquettes:**

Le plasma enrichi en plaquettes, est un plasma au sein duquel les plaquettes ont été préservées grâce à un protocole de centrifugation doux. Il est obtenu à partir de sang total frais (prélevé depuis moins de 6 heures) maintenu à température de 10°C et centrifugé à 2000 tours/min pendant 20 minutes. Celui-ci se conserve à la température ambiante pendant 5 jours et avec un système d'agitation continue (fig.8)



**Figure n°08:** L'appareil d'un système d'agitation continu pour la conservation des plaquettes (photo personnelle).

### **I.2.3 Risque et complications:**

Toujours, le risque transfusionnel existe mais reste par définition inférieure au risque de ne pas être transfusé si l'indication de cette dernière a été posée. Les risques sont d'origine immunologique, infectieuse ou liés aux volumes transfusés.

#### **➤ Les risques immunologiques:**

1- Incompatibilité transfusionnel érythrocytaire: elle est à priori écartée par les tests faits sur le donneur et le receveur. L'accident ABO souvent grave ne devrait pas se voir car parfaitement évitable et toujours du à une erreur humaine.

2- Incompatibilité leuco-plaquettaire due à la présence d'anticorps anti HLA chez le donneur qui peut entraîner une atteinte pulmonaire grave.

3- Purpura post transfusionnel plusieurs jours après une transfusion de plaquettes homologuées. Le malade détruit ses propres plaquettes (Genet et 1992).

#### **➤ Les risques infectieux:**

1- Risque bactérien du à la contamination bactérienne du produit transfusé ,ce type d'accident est rare mais très grave.

2- Risque de contamination virale (hépatite, HIV.....). Les maladies à prions posent d'autres problèmes non résolus directement. On minimise ces risques en tenant à détecter les porteurs de virus, de rejeter les donneurs à risque. Les risques de surcharge transfusionnelle: qui peuvent entraîner:

1- Un O.A.P (Œdème Aigu du Poumon), par excès de volume en circulation.

2- Hypocalcémie due à la surcharge en citrate.

3- Hémochromatose par surcharge en fer après des centaines de transfusions (Smaili, 2005).

## II.1.Virus de l'hépatite B (VHB)

### II.1.1. Généralités

Le virus de l'hépatite humaine (VHB) est un virus à acide désoxyribonucléique (ADN) (Pol et Fantaine, 1998). Appartenant à la famille des Hépadnaviridae au genre des Orthohépadnavirus (Locarnini, 2004 ; Seeger et Mason, 2000) (Fig. 9).

L'HBV a un tropisme essentiellement hépatocytaire mais l'ADN viral peut être retrouvé dans différents types cellulaires tel que les cellules de la moelle osseuse, les cellules mononucléées du sang périphérique (monocytes, lymphocytes B et T) (Denis et Mahony, 1999 ; Seeger et Mason, 2000). La particule virale est sphérique de diamètre compris entre 42 et 47 nm à l'intérieur de laquelle se trouve la particule du core (ou la nucléocapside) d'un diamètre de 22 à 25 nm. Celle-ci comprend les antigènes: Ag HBc, Ag HBe, l'ADN viral, l'ADN polymérase et une protéine kinase (Francis et Mahony, 1999). Le sérum des patients infectés peut contenir deux particules distinctes :

- ✓ des virions complets (ou particules de Dane) est une particule virale infectieuse comporte une enveloppe externe et une capsid, l'enveloppe porte des déterminants antigéniques qui définissent l'antigène de surface du virus appelé Ag HBs, cet antigène de surface induit la synthèse d'anticorps anti HBs qui protège généralement l'individu contre une nouvelle infection par le virus de l'hépatite B.
- ✓ des enveloppes vides sous forme sphérique de 16 à 25 nm de diamètre ou filamenteuse de 22 nm et de longueur variable sont des formes incomplètes de l'enveloppe virale ne contenant aucun élément de la capsid ils présentent que l'Ag de surface (Zarski et al., 1993 ; Francis et Mahoney, 1999).

Il existe quatre sous types du VHB : adw, adr, ayw, ayr. Ils ont en commun le déterminant antigénique « a » auquel sont associés quatre autres selon le sous type (Kremsdorf et al., 1990 in Zarski et al., 1993). Les deux déterminants **d** et **y** sont associés avec l'apparition respective de Lysine ou Arginine en position 122. Par contre, **w** et **r** correspondent à la présence respective de Lysine ou Arginine en position 160 (Howard et Allison, 1995).

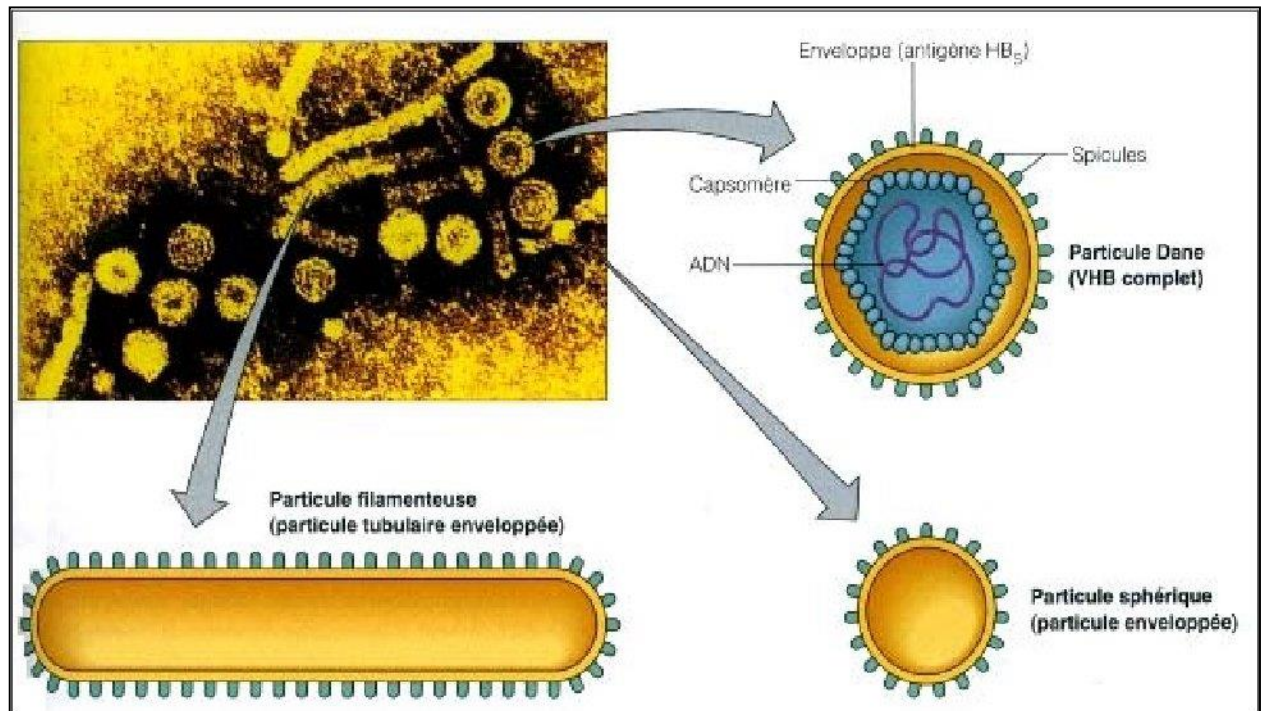


Figure 9 : Structure de virus HBV(Howard et Allison, 1995)..

### II.1.2 Manifestations cliniques de l'infection par le VHB :

L'hépatite aiguë dure d'un à six mois y compris une période d'incubation asymptomatique de quelques semaines (Seeger et Masson, 2000).

Quand l'infection se manifeste, c'est souvent sous les symptômes cliniques suivants :

Asthénie, Anorexie, fièvre, nausées, douleurs abdominales et articulaires. Parfois une choléstase se présente et qui est due au dysfonctionnement du foie se traduisant par : un ictère, des urines foncés ainsi que des selles décolorés (Kenneth et *al.*, 1994). Cependant, des manifestations extra hépatiques peuvent se présenter sous forme d'Arthralgie, d'Arthrite et d'éruptions cutanées (urticaire) (Mahoney, 1999).

Les symptômes sont très fortement liés à l'âge de la personne. Généralement, les nouveaux nés sont asymptomatiques alors que les enfants plus âgés et les adultes sont symptomatiques dans 33 à 50% des cas (Mahoney, 1999).

Environ 0,5 à 1% des hépatites aiguës symptomatiques évoluent vers une hépatite fulminante fatale (Seeger et Masson, 2000). Celle-ci est précédée par une phase aiguë sévère caractérisée par un taux de prothrombine inférieur à 50% (Dupeyron, 2001). Cette forme est

caractérisée par une nécrose cellulaire massive du foie, détérioration sévère des fonctions hépatiques accompagnée d'une encéphalopathie hépatique, d'insuffisance rénale, cardiaque et respiratoire (Mingfeng Liu et *al.*, 2001). L'endommagement massif du foie nécessite une transplantation hépatique d'urgence.

### **II.1.3 Mode de transmission:**

Le HBV se transmet par effraction cutanée ou par contact des muqueuses avec du sang ou d'autres liquides organiques contaminés.les concentrations les plus élevées du virus se retrouvent dans le sang et les lésions suintantes alors qu'on relève des concentrations modérées dans le sperme et les sécrétions vaginales et des concentrations plus faibles dans la salive. Le HBV ne se transmet pas par l'air, l'eau ou les aliments (Deny, 2002).

## **II.2. Virus de l'hépatite C (VHC)**

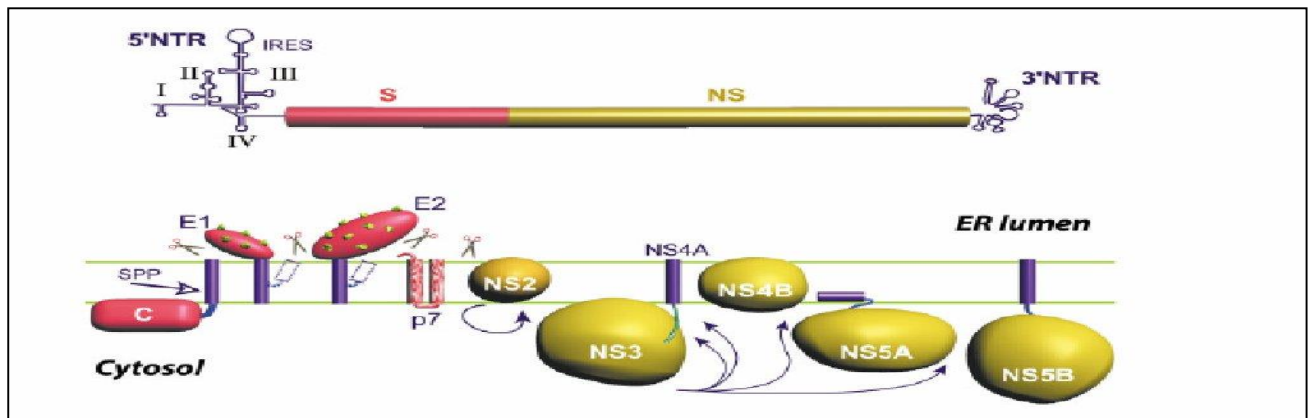
### **II.2.1. Généralités**

Le VHC est un virus à ARN enveloppé appartenant à la famille des *Flaviviridae* au genre *Hepacivirus* (Giannini et Bréchet, 2003 ; Penin et *al.* 2004).

La particule virale a un diamètre compris entre 50 et 70 nm (Shimizu et *al.*, 1996, *in* Kato, 2001), et un poids moléculaire qui serait voisin de 4106 daltons (Lunel-Fabiani, 1993). A l'intérieure de celle ci se trouve une nucléocapside constituée de protéine C qui présente une symétrie icosaédrique. Cette capsid est entourée d'une enveloppe lipidique d'origine cellulaire sur laquelle sont insérées deux protéines distinctes sur l'information virale E1 et E2 organisées en complexes cimérique non covalents (Pawlosky, 2003).Dans le sérum d'un patient infecté, plusieurs formes du virus peuvent exister:

- ☒ Des virions liés à des lipoprotéines de basse densité (LDL). Ils semblent être les particules infectieuses.
- ☒ Des virions liés à des immunoglobulines ;
- ☒ Des virions libres.

Outre ces formes, des particules virales ont été détectées dans le plasma présentant des propriétés physicochimiques, morphologiques et antigéniques d'un VHC non enveloppé (Maillard et *al.*, 2001 Penin et *al.*, 2004).



**Figure 10:** La structure de virus de HCV(Lunel-Fabiani, 1993)..

### II.2.2. Aspects cliniques de l'infection par le VHC

La période d'incubation du VHC est plus courte que celle du VHB. Elle dure en moyenne six semaines. Cependant, elle est dans la plupart des cas variable pouvant aller de quelques jours à quelques mois.

L'hépatite aiguë C est dans 90 % des cas asymptomatique passant ainsi inaperçue (Belataf et Boukrine, 2002). Ces formes asymptomatiques ne peuvent être associées qu'à une élévation des transaminases (Fleury, 1999).

La tendance à la chronicité est de 70 à 80 % des cas d'infection (Liang et *al.*, 2000). Celle-ci est caractérisée principalement par l'élévation des ALAT pendant une période supérieure à six mois (Kato, 2001).

Le diagnostic de cette infection se fait généralement tardivement, environ une vingtaine d'années après la contamination (Tortora et *al.*, 2003), le plus souvent au stade d'hépatite chronique et même parfois au stade de cirrhose (Belataf et Boukrine, 2002). Cependant, le diagnostic sérologique repose principalement sur la détection des anticorps anti VHC qui sont synthétisés environ une à trois semaines après les manifestations cliniques (Kenneth et *al.*, 1994).

**II.2.3. Mode de transmission:**

Le virus de l'hépatite C est essentiellement transmis par des transfusions de sang et les injections intraveineuses des toxicomanes ,par contre la transmission sexuelle est d'une importance beaucoup plus faible que pour le virus de l'hépatite B (Brechot et Pol ,1993).

**II.3.Virus de l'immunodéficience humaine: HIV****II.3.1. Généralités :**

Le virus de l'immunodéficience humaine HIV fait partie de la famille des Rétrovirus au genre Lentivirus ayant un tropisme pour les lymphocytes CD4+ et les monocytes (Barin, 2002). Il s'agit d'un virus possédant un génome sous forme deux molécules d'ARN monocaténaire, identique, associé, contenues dans la capsid (Fleury, 1997) (**Fig. 11**). En microscopie électronique HIV1 et HIV2 après avoir été libérés par bourgeonnement à la surface des cellules qui les produisent, sont des particules de 90 à 120 nm de diamètre (Mohamadi, 2001). Ils sont entourés par une enveloppe formée d'une double bicouche lipidique d'origine cellulaire et de deux glycoprotéines virale.la glycoprotéine transmembranaire d'un poids moléculaire de 41000 kD traverse la double couche lipidique. elle est attachée par des liaisons faibles non covalentes à la glycoprotéine d'enveloppe externe d'un poids moléculaire de 12000 kD qui fait saillie à la surface du virus sous forme de spicule (Fleury ,1997).

La capsid virale apparaît sous forme allongée de trapèze au centre de la particule virale. Elle est constituée par une protéine interne majeure la p24 dont le poids moléculaire est de 24000 kD.la protéine la plus interne associée à l'ARN à un poids moléculaire de 15000 (p15). La protéine la plus externe de poids moléculaire de 1800 (p18) est encore appelée protéine de membrane ou de matrice.

La structure des HIV2 est similaire seuls changent les poids moléculaire des protéines et les enzymes constituent de ce virus (Brun-Vezinet, 1996).

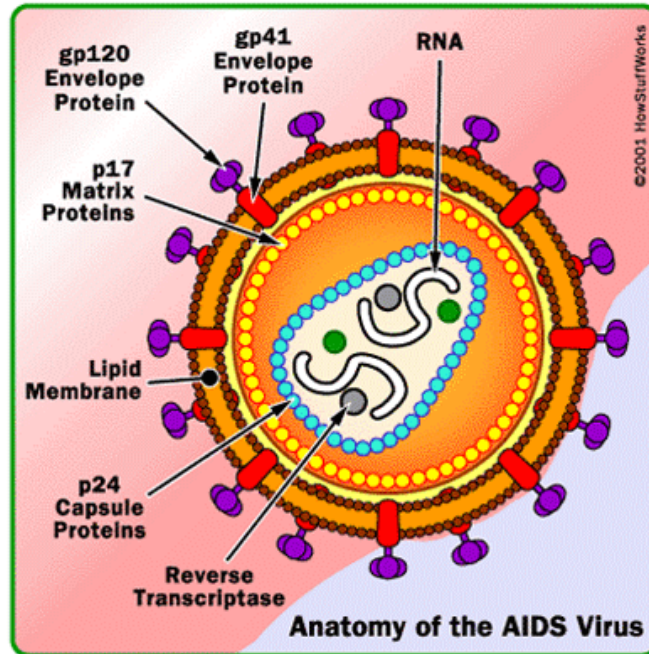


Figure11 : Structure de virus de HIV(Mohamadi, 2001).

### II.3.2. Réponse immunitaire à l'infection par le HIV:

Après stimulation, les antigènes sont présentés par les cellules sentinelles (macrophage, cellules dendritiques) sécrètent des cytokines (Brin et Wainberg, 2003).

Ces dernières agissent sur les lymphocytes T CD4+ et induisent leurs différenciation soit vers l'activation de l'immunité cellulaire (lymphocytes TH1): IL-12, soit vers l'activation de l'immunité humorale (lymphocytes TH2): IL-4, IL-10 (Lodge et *al.*, 1998).

La balance entre les deux formes d'activation est en fonction de la nature de l'antigène et de la génétique de l'hôte. Il existe des mécanismes de régulation en continu entre l'intensité des deux types de réponse.

- ➔ la réponse de type cellulaire prédomine pendant la phase asymptomatique de l'infection à HIV.
- ➔ la réponse de type humorale prend le dessus pendant phase asymptomatique.

La production d'anticorps contre les différentes protéines du HIV est constante et vigoureuse. Elle est à la base du diagnostic de séropositivité. Les anticorps neutralisants sont

essentiellement dirigés contre les glycoprotéines de surface (Brun-Vezinet et Wainberg, 2003).  
Le rôle des anticorps dans l'infection à HIV est paradoxal:

→ soit il contribue à la défense immunitaire par un effet neutralisant direct ou par l'intermédiaire du phénomène de cytotoxicité anticorps (IgG) dépendant (ADCC)

→ soit il augmente la diffusion des virus sur lesquels ils sont fixés en permettant la pénétration dans la cellule cible par l'intermédiaire du fragment Fc ou du récepteur du complément (anticorps facilitant) (Brun et Wainberg, 2003).

### **II.3.3. Mode de transmission:**

La pénétration du virus dans l'organisme se fait pour l'essentiel par cinq voies principales:

1. Les rapports sexuels non protégés.
2. La transmission de la mère à l'enfant.
3. La manipulation imprudente d'un blessé infecté qui saigne
4. Les transfusions de sang et de dérivés sanguins.
5. Toutes effractions cutanées ou muqueuses par un instrument contaminé (Normad et Martet, 1997).

### **II.4 Tests de dépistage des trois maladies précédentes:**

#### **II.4.1 Les tests Immuno-Enzymatiques :**

Ce sont des techniques appliquées à la recherche d'Antigène (Ag) ou d'anticorps (Ac) dans le plasma ou le sérum humain. L'antigène ou l'anticorps recherché va entrer en réaction avec respectivement l'anticorps ou l'antigène fixé sur la phase solide (cupule de la microplaque) (Bachir, Pacha, 1990).

↘ la réaction Ag-Ac est détectée par l'addition d'un conjugué Ac ou Ag sur lequel est fixée une enzyme.

↘ la présence de l'enzyme conjuguée (fixée sur le complexe Ag-Ac) est révélée par un substrat qui passe d'une phase non colorée à une colorée comme suite à une catalyse par cette enzyme.

↘ la densité optique DO de la solution est mesurée par un spectrophotomètre ou un fluorimètre selon le type de réaction.

✚ les résultats sont habituellement exprimés par un ratio qui correspond au rapport du signal de l'échantillon sur le signal du seuil établi pour chaque trousse utilisée.

**Ratio=DO de l'échantillon/DO de la valeur seuil.**

✚ le ratio est proportionnel à la quantité de marqueur présente dans le sérum.il est inversement proportionnel pour les techniques par compétition. On a trois méthodes:

➤ **ELISA sandwich:**

✚ le marqueur recherché (Ag ou Ac) se trouve pris entre deux couches opposées du marqueur spécifique et de même nature.

✚ le premier marqueur est fixé sur la phase solide tandis que le 2ème est apporté sous forme de conjugué (marqueur + enzyme).

✚ l'élément recherché pris en sandwich est apporté par le sérum ou le plasma à étudier.

✚ la révélation se fait grâce à l'adjonction d'un substrat spécifique de l'enzyme avec l'apparition d'une réaction colorée.

✚ l'intensité de la coloration est proportionnel a la quantité d'Ac ou d'Ag présent dans le sérum ou le plasma.

➤ **ELISA indirect:**

✚ le principe repose sur l'utilisation d'une phase solide sensibilisée par des antigènes purifiés pour une recherche d'Ac spécifique.

✚ la révélation du complexe Ag-Ac se fait par addition d'un conjugué constitué par des immunoglobuline anti IgG humaines couplées à une enzyme (peroxydase, phosphatase alcaline.....).

✚ la révélation de l'activité enzymatique se fait par addition d'un substrat dont la modification se traduit par l'apparition d'une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'Ac présente dans le sérum étudié.

✚ l'intensité de la coloration est déterminée par la mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre approprié (lecteur de micro plaques ELISA).

➤ **ELISA compétition:**

➤ cette technique est basée sur une compétition vis-à-vis d'un Ag fixé sur une phase solide entre les anticorps recherchés dans l'échantillon et un conjugué fourni par la trousse de diagnostique. Ce conjugué est constitué d'Ac de même spécifique que les Ac recherchés dans l'échantillon.

➤ le conjugué et l'échantillon sont introduits simultanément dans le milieu réactionnel de façon à entrer en compétition pour la fixation sur l'Ag de la façon solide. Cette fixation est influencée par la différence d'affinité des Ac du conjugué et de l'échantillon vis-à-vis de l'Ag.

➤ la nature du complexe Ag-Ac formé révélée par l'addition du substrat de l'enzyme va se traduire par une coloration d'intensité inversement proportionnelle à la quantité d'Ac présent dans le sérum.

➤ l'intensité de la coloration est déterminée par la mesure de la densité optique à l'aide d'un lecteur de microplaques ELISA plus faible sera la densité optique plus élevée sera la quantité d'Ac présent dans l'échantillon.

➤ l'interprétation des résultats est basée sur le calcul d'un seuil d'inhibition indiqué par le fabricant.

**II.4.2 Le test rapide (les bandelettes):**

C'est un test immuno-chromatographique donc une méthode de séparation traduite par une couleur (principe de la chromatographie) s'il ya formation de la chaine Ag-Ac (réaction immunologique) dans la zone qui contient l'Ag ou l'Ac correspondant.

**II.5. La syphilis**

**II.5.1. Généralités:**

La syphilis est une maladie contagieuse dont l'agent pathogène est le tréponème pale (*Treponema pallidum*).la transmission se fait habituellement par contagion (Rubin, 1995). Elle peut aussi être transmise par voie transplacentaire et exceptionnellement par transfusion sanguine (Nauciel, 2000).

*La tréponème pallidum* est un parasite de forme hélicoïdale très fine non colorable par la méthode usuelles (Nauciel, 2000) mesurant environ 1 µm d'une crête à l'autre et un peu plus en profondeur sa longueur varie de 5 à 20 µm selon le nombre de spires alors que sa largeur est seulement de 0.25 µm appartenant à la famille des Spirochaetaceae strictement humaine et

uniquement connue comme pathogène, il n'existe qu'une espèce mais quatre sous espèces sont identifiées et correspondent à des maladies différentes. *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* ou *Treponema pale* est l'agent de la syphilis vénérienne, maladie strictement humaine à transmission habituellement directe au cours des rapports sexuels et de répartition mondiale.

*Treponema pallidum* subspecies *endemicum* est l'agent de la syphilis endémique non vénérienne ou banal limitée aux régions désertiques et *Treponema pallidum* subspecies *carateum* est l'agent de la pinta ou carate observée seulement en Amérique centrale et du sud, d'autres tréponèmes sont responsables de maladies à transmission non vénérienne: *Treponema pallidum* subspecies *pertenue* est l'agent du piande distribution tropicale et subtropicale (Flandrois, 1997).

### II.5.2 Pouvoir pathogène:

La syphilis évolue classiquement en trois stades:

- **stade primaire:** se traduit par un chancre qui se développe au point d'inoculation en générale 2 à 3 semaines après le contacte infectant.il s'agit d'une ulcération superficielle reposant sur une base indurée généralement indolore. Elle siège le plus souvent sur les organes génitaux (pénis, glande lèvres, col utérin) mais des localisations extra génitales peuvent se rencontrer (ano-rectale, buccale, labiale).

- **Stade secondaire:** se traduit par une éruption diffuse intéressant en particulier les paumes des mains et la plante des pieds, des plaques muqueuses et parfois des lisions végétantes (*Condylomata lata*) une alopecie en clairière.

- **Stade tertiaire:** se manifeste après un intervalle libre (syphilis latente) de plusieurs années. Elle peut se traduire par des atteintes cardiovasculaire (aortite anévrysme) des atteintes neurologiques (paralyse générale, tabès), des gommages syphilitiques (Nauciel, 2000).

### II.5.3. Diagnostiques biologiques:

#### ➤ Diagnostique directe:

le diagnostique de la syphilis doit être envisagé en présence de toutes ulcération ou érosion génitale ou anale, la recherche directe des tréponèmes au niveau des lésions érodées primaires ou secondaires se fait au microscope équipé d'un condensateur à fond noir le test ELISA est

aussi utilisé mais le diagnostique doit être systématiquement complété par une étude sérologique (Flandrois, 1997). Le test rapide(les bandelettes).

➤ **diagnostique indirects:**

Deux groupes de réactions sérologiques sont appliquées au diagnostique de la syphilis utilisant deux types d'antigène pour rechercher les anticorps : l'antigène cardiologique et les antigènes tréponimiques. Il est obligatoire de pratiquer les réactions sérologiques avec ces deux types de réactifs REF.

1. Réactions utilisant l'antigène cardiologique:

Les études ont montré que l'antigène reconnu par les anticorps des malades était un phospholipide présent dans le foie normale et que l'on pouvait l'extraire également du cœur (d'où la dénomination d'antigène cardiologique).

La technique la plus courante est le VDRL (venereal disease research laboratory), il s'agit d'une réaction d'agglutination utilisant un antigène sous forme de microparticule.les anticorps dirigés contre l'antigène cardiologique sont parfois désignés sous le nom de réagines.des réactions faussement positives peuvent s'observer de manière transitoire au cours de diverses infections et en cours de grossesse et de manière stable au cours de maladies auto-immunes ou de dysglobulinémies.des réactions faussement positives peuvent aussi s'observer chez les héroïnomanes REF.

2. Réactions utilisant des antigènes tréponémiques:

Elles sont pus sensibles et plus spécifiques mais ne permettent pas de distinguer les différentes infections à tréponèmes entre elles. Le TPHA *Treponema pallidum* Héma Agglutination Assay est un test d'héma agglutination passive utilisant des globules rouges sensibilisés avec un lysat de tréponèmes.

Le FTA Fluoescent Tréponéma Antibody est un test d'immunofluorescence indirecte utilisant *T pallidum* comme antigène sa spécifité est améliorée par une absorption préalable du sérum par un extrait de tréponème non pathogène (FTA-Abs).

Le TPI *Treponema pallidum* immobilisation ou test de Nelson nécessite une suspension de *T. pallidum* vivants. Il n'est utilisé que dans des cas d'interprétation délicate (Nauciel, 2000).

### III. 1 Généralité

La brucellose est une maladie bactérienne infectieuse, due à une bactérie du genre : *Brucella*. Elle est commune à de nombreuses espèces animales (ovins, caprins, bovins...), et touche même l'homme. Chez l'animal, elle se manifeste, principalement, par des avortements chez la femelle et par l'atteinte des glandes génitales chez le mâle.

Chez l'homme la brucellose est une maladie qui se manifeste chez 20 à 40 % des cas par des complications viscérales sévères (osseuses, neurologiques...) (Aubry, 2002). D'après Mennencier, (2002), elle peut même passer à la chronicité engendrant ainsi des répercussions psychiques et sexuelles assez importantes. En plus de sa gravité sanitaire, la brucellose se répercute sur le plan économique par des frais qualifiés de directes tels que le coût de l'hospitalisation et du traitement et d'autres indirectes représentés essentiellement par les frais occasionnés par le transport des patients (Ganière, 1990).

Rouibet et Saidj, (2003) indiquent que la brucellose est aussi appelée en fonction de la zone de sa découverte ou des symptômes qu'elle provoque : Fièvre de malte, fièvre méditerranéenne, fièvre de Gibraltar, fièvre sudoro-algique, fièvre abortive, avortement infectieux, avortement contagieux.

#### III.1.1. Classification :

**Règne :** Procaryotes

**Division :** Gracilicutes

**Famille :** Parvobacteriaceae / Brucellaceae.

**GENRE :** *Brucella*

Le principal agent de la maladie est *B. melitensis* qui comporte trois biotypes. Cependant on a trouvé parfois des infections à *B. suis* et *B. abortus*. A l'heure actuelle, six espèces de *Brucella* sont identifiées. Leur hôte naturel, fréquence et gravité de la maladie humaine sont rapportés dans le tableau 1. Les caprins sont infectés essentiellement par *B. melitensis* (Ganière, 1990).

**Tableau 1** : caractères différentiels des différentes espèces de *Brucella* (Benhassine et Djellouli, 2003).

Espèces	Hôtes naturels	Les maladies humaines (fréquence et gravité)
<i>Brucella melitensis</i>	Ovins, caprins et actuellement les bovins.	80% des cas humains
<i>Brucella abortus</i>	Bovins	provoque une maladie grave.
<i>Brucella suis</i>	Porcins, lièvres, rennes	/
<i>Brucella ovis</i>	Ovins	15% des cas humains moins grave
<i>Brucella canis</i>	Chiens	/

### III.1.2. Caractères biochimiques

D'après (Perlman, 1973) Les *Brucella* sont aérobies stricts et ont les caractères généraux des agents aérobies stricts; cependant certaines souches exigent 5 à 10 p100 de CO<sub>2</sub>. Toutes les espèces de brucella ont une catalase (+) ; oxydase (+) sauf pour *B. neotomae*, *B. ovis* et parfois pour *B. abortus*, uréase (+) ; ne liquéfie pas la gélatine. Absences d'hémolyses sur gélose. Réaction négative au rouge de méthyle. Ne produit pas le O-nitrophénol (à partir de nitrophenyl-B-Dgalactoside) ; nitrate réductase (+). Cytochrome C.

#### ➤ Conditions de croissances

Le pH exigé pour la croissance des *Brucella* varie entre 6.6 et 7.4; toutefois le pH optimal se situe à 6.8. La température de culture peut varier 20 à 37 °C, La température optimale de croissance étant de 34 °C bien que les *Brucella* soient habituellement cultivées à 37 °C. Les *Brucella* sont aérobies strictes et l'aération des cultures par agitation ou par apport direct d'oxygène augmente leur taux de croissance. De nombreuses souches de *B. abortus* exigent à l'isolement une teneur en gaz carbonique de 5 à 10 p. 100. Assez fréquemment ces souches

CO<sub>2</sub>-dépendantes deviennent après plusieurs repiquages, capables de pousser à l'air libre en raison de la sélection et du développement de mutants CO<sub>2</sub>-indépendants.

L'ion ammonium constitue une source d'azote suffisante pour certaines souches mais la croissance est moins bonne que si on leur fournit des acides aminés. D'autres souches sont plus exigeantes et nécessitent plusieurs acides aminés. Bien que les *Brucella* réduisent les nitrates en nitrites, les nitrates ne sont pas utilisés comme source d'azote.

Le glucose est le sucre habituellement utilisé mais peut être remplacé par le galactose ou le fructose, ainsi que par l'acide lactique. Le L-gluconate ou l'asparagine peuvent être en même temps source d'azote et de carbone.

Bien que la plupart des milieux contiennent du chlorure de sodium, les ions sodium peuvent être remplacés par les ions potassium. Le soufre peut être apporté sous forme organique ou minérale, le magnésium et le fer sont indispensables, tandis que la nécessité du manganèse est discutée. La thiamine, la niacine et la biotine sont des vitamines indispensables tandis que de nombreuses souches de *B. abortus*, *B. melitensis* ou *B. suis* exigent en outre du pantothénate de calcium et de l'acide nicotinique (Roux; 1989).

### III.1.3. Caractères antigénique :

Les *Brucella* possèdent des antigènes de structure lipopolysaccharidique appelés A et M inégalement répartis selon les espèces. L'antigène A domine chez *B. abortus*, M chez *B. melitensis* et existe en proportion intermédiaire et égale chez *B. suis*. Les autres espèces sont dépourvues de ces antigènes. Ceci explique qu'un sérum anti-*Brucella* obtenu avec n'importe laquelle des trois espèces agglutine toutes souches de toutes les espèces (Pilet et *al.*, 1997).

Roux (1989) révèle que Les antigènes A et M sont situés sur un seul complexe antigénique lipopolysaccharide-proteine de haut poids moléculaire, absent des souches R (Les mutants R obtenus à partir des *Brucella* S perdent le LPS-S, qui est remplacé 'par un LPS-R commun à toutes les espèces de *Brucella* sous forme R. *B. ovis* et *B. canis* n'ont pas d'antigène A et M, mais possèdent l'antigène R. Toutes les souches ayant l'antigène R sont agglutinées par les sérums anti-R).

Le polysaccharide B, bien qu'associé à la paroi, n'intervient pas dans l'agglutination des bactéries. Il est identique dans toutes les espèces de *Brucella*, S ou R.

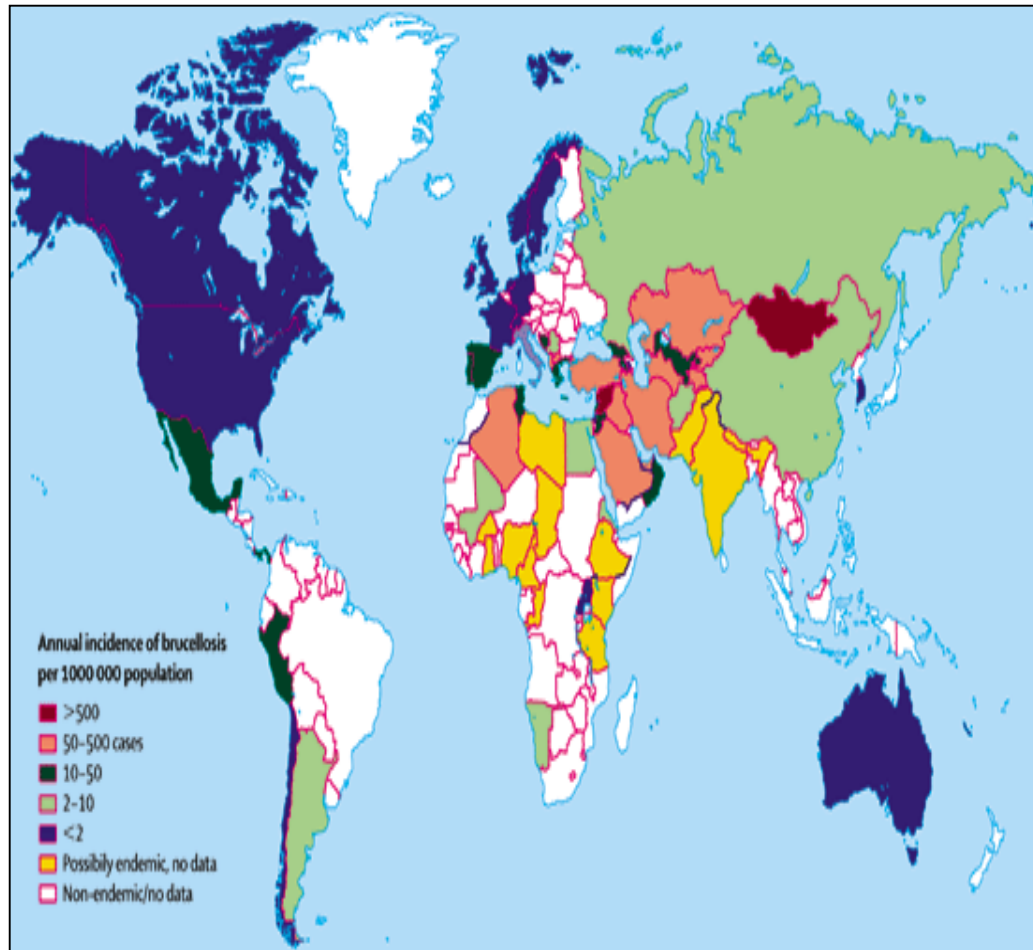
➤ **Antigènes communs avec d'autres bactéries**

Il existe des antigènes communs, à *Brucella* et à d'autres bactéries (*Yersinia enterocolitica* 09, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*). La réaction croisée entre *Brucella* et *Yersinia* est due au LPS-S, dont certains déterminants sont communs à *Brucella* et à *Yersinia*.

Cette communauté antigénique peut expliquer l'existence d'un faible taux d'agglutinants et les sensibilisations chez les sujets qui n'ont pourtant pas été en contact avec *Brucella*. De nombreux types d'anticorps sont élaborés par les organismes infectés par *Brucella*. Il convient de citer en particulier les anticorps agglutinants et les sensibilisatrices. Notons la présence fréquente d'anticorps incomplets dit bloquants qui peuvent fausser les résultats de certaines réactions sérologiques ; une réaction de Coombs permet de les mettre en évidence. (Pilet et *al.*, 1997).

### III.2. Répartition géographique du genre *Brucella*:

La brucellose animale est répandue dans le monde entier( **fig 12**) particulièrement dans les pays méditerranéens, le moyen orient, l'Asie et l'Amérique du Sud Ganière J.P(1990)



**Figure 12:** Répartition géographiques des espèces causales Ganière J.P(1990)

Les trois principales espèces de *Brucella* sont retrouvées dans la plupart des régions du monde, avec des dominances légèrement différentes d'une région à l'autre. C'est ainsi que : *Brucella abortus* : prédomine nettement en Afrique, en Amérique du sud et en Asie (Aubry, 2002). *Brucella suis* : prédomine en Europe centrale et en Amérique du nord (Aubry, 2002). *Brucella melitensis* : abondante surtout dans le bassin méditerranéen (Mennecier, 2002).

### **III.2.1. au niveau du Maghreb**

Dans les pays du Maghreb, depuis leur indépendance, la maladie est demeurée plus ou moins ignorée. Certains des foyers sporadiques ont été signalés, mais leur fréquence et leur importance sont loin de refléter la véritable situation épidémiologique sur le terrain, surtout pour les pays possédant de grands effectifs de caprins et d'ovins (Anonyme, 1994).

D'ailleurs, en 1982, un rapport de la F.A.O sur la brucellose au Proche-Orient faisait état de l'absence probable de la brucellose en Algérie, Maroc et Libye (Boudilmi et *al.*, 1991).

Au Maroc, il semble que ce soit en 1916 à El-Djadida, qu'avaient été diagnostiqué les premiers cas de fièvre de Malte chez l'homme et par conséquent des foyers d'animaux ont été décelés (Ouaired, 1997).

En Tunisie, il a été noté l'apparition d'une flambée épidémique de la maladie à Gafsa en 1991. (Boudilmi et *al.*, 1991).

### **III.2.2. Au niveau national**

En Algérie, la brucellose animale n'a été recherchée que lorsque l'homme en a été le révélateur. Ainsi, le silence épidémiologique demeure jusqu'en 1984, où on a assisté à l'apparition de plusieurs cas de brucellose humaine à Ghardaïa (Boudilmi et *al.*, 1991).

## **III.3. Fréquence chez l'homme :**

### **III.3.1 Au niveau mondial**

Chaque année, on enregistre environ un demi million de cas de brucellose chez l'homme dans le monde. La prévalence de l'infection dans les réservoirs animaux conditionne sa fréquence chez l'homme (Tableau 2).

FAO / OMS (1990) indique que les cas de brucellose humaine sont plus nombreux dans les pays où l'incidence de l'infection par *B. melitensis* chez les caprins et/ou les ovins est élevée.

Les programmes de contrôle et d'éradication de la brucellose bovine réduisent de façon sensible l'incidence de la maladie chez l'homme, par exemple :

Au Danemark, alors qu'environ 500 cas par an signalés de 1931 à 1939, la brucellose humaine avait disparu en 1962, résultat de l'éradication de l'infection chez l'animal.

**Tableau 2:** La fréquence de brucellose au niveau mondiale FAO / OMS (1990).

Declarés Indemnes	PREVALENCE		
	Très Faible à Moyenne		
Autriche	Australie	Arabie Saoudite	Burkina Fasso
Canada	Chypre	Argentine	Ethiopie
Finlande	Corée	Colombie	Malawi
Grande Bretagne	Taiwan	Iran	Nigeria
Irlande	Yougoslavie	Mexique	Oman
Japon	Afrique du sud	Uruguay	Ouganda
Norvège	Chili	Zaïre	République Centre Afrique
Autriche	Australie		Burkina Fasso
Pologne	Cuba		Zambie
Allemagne	France		Zimbabwe
Roumanie	Italie		
Suisse	Malaisie		
Tchécoslovaquie	Nouvelle Zélande		
	Portugal		

### III.3.2. Au niveau national

L'incidence de la brucellose humaine en Algérie a connue une nette progression dans cette dernière décennie, fluctuante d'une région à l'autre (Boudilmi, et *al.*, 2001). La brucellose humaine sévit sur l'ensemble des wilayas du pays, mais les incidences les plus élevées sont enregistrées dans celles connues endémiques (Tableau 3).

**Tableau 3:** Répartition de la brucellose humaine dans les wilayas de l'Algérie connues endémiques de 1992 à 2000 (INSP, 2001).

Wilaya	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Naama	21	164	379	597	480	00	280	09	133
Bayadh	269	274	52	297	305	07	68	45	41
Ghardaïa	76	254	52	124	59	06	21	00	22
Laghouat	20	93	69	91	248	297	594	467	198
Biskra	345	421	295	467	62	01	372	740	709
Khenchela	40	59	12	15	106	21	39	02	134
Tebessa	01	05	00	00	351	00	573	379	727
saida	30	58	64	75	137	23	16	47	44
M'sila	04	105	03	378	105	00	304	214	966
Ain timouchent	19	38	30	11	10	435	22	38	08

#### III.4. Réservoir

Le réservoir est exclusivement animal et il est constitué par les animaux infectés, spécialement le bétail élevé par l'homme (bovins –petits ruminants).

##### III.4.1. Animale:

On considère d'après Roux (1989) et Keinboun (1982, 1990) que :

- *Brucella melitensis* sévit chez les caprins et ovins.
- *Brucella abortus* chez les bovins.
- *Brucella suis* chez les porcins.

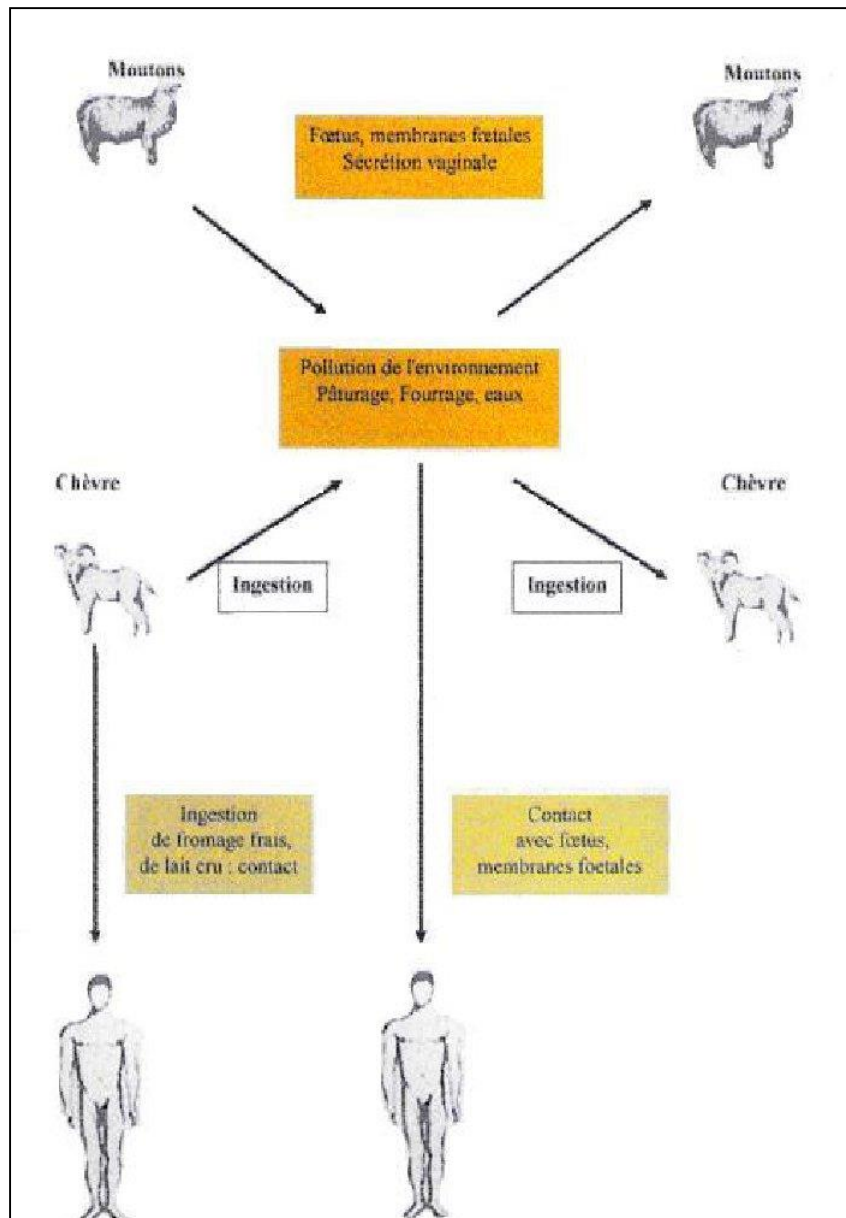
Cependant, il est à noter que beaucoup de références bibliographiques rapportent que cette répartition spécifique est actuellement rejetée du fait qu'une même brucella est susceptible de contaminer plusieurs espèces animales et d'autre part une même espèce peut être contaminée par diverses *Brucella*.

### III.4.2 Homme

L'homme peut constituer un réservoir occasionnel, qui se contamine par les animaux infectés et leurs produits Selon (Khiati, 1998) Henri et *al.* (1967) et Roux (1989).

### III.5. Transmission:

La brucellose se transmet par différentes voies animales et humaines selon la( **fig 13**) ci-dessous.



**Figure 13:** Les différentes voies de transmission de la brucellose animale et humaine (Khiati 1998).

### III.5.1. La transmission animale

Comme a été indique par Henri et *al.* (1967) La transmission de *brucella* parmi les animaux est facilitée par l'habitude de réunir ou de faire paître les différents troupeaux ensemble (marché), La maladie animale est dominée par l'atteinte de l'appareil génital.

Les Véhicules de brucella sont essentiellement des produits de l'avortement ou de la mise bas ; les sécrétions génitales ; le lait et ses dérivés.

### III.5.2. La transmission chez l'homme :

#### ➤ Contamination voie cutanée ou muqueuse

D'après Perlaman, (1973) ; la contamination par voie cutanée ou muqueuse est le mode dominant (**Fig. 14**). Elle se fait par le Contact direct (pénétration du germe par voie cutanée ou muqueuse favorisée par des blessures ou des excoriations) avec des animaux malades, par les carcasses ou mieux, par les produits d'avortement (placenta, sécrétions vaginales) ou encore par contact accidentel au laboratoire avec des prélèvements (hémocultures).



**Figure 14:** La transmission de brucellose par voie cutanée (Perlaman, 1973)

➤ **Contamination par voie digestive**

Pasteur Vallery-Radot et *al.* (1963) et (Acha et Szyfres, 1989) ont affirmé que la contamination par voie digestive fait par :

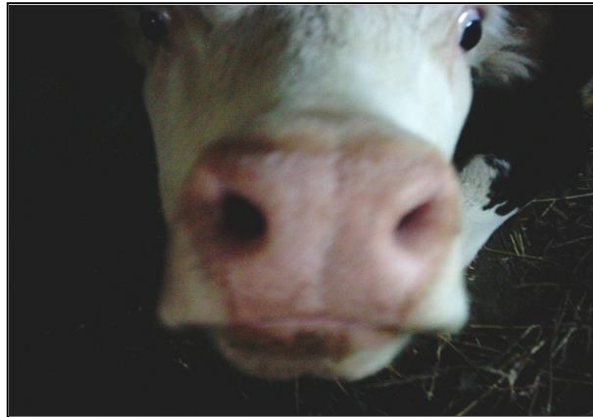
- ✓ Ingestion d'aliments contaminés (lait et produits dérivés non pasteurisés, plus rarement crudités contaminées par du fumier ou exceptionnellement viande insuffisamment cuite).
- ✓ Les mains contaminées par un produit souillé peuvent entraîner exceptionnellement une contamination par voie digestive (**fig 15**)
- ✓ L'eau ou les légumes crus contaminés par des excréments d'animaux (Anonyme, 1964).



**Figure 15:** La transmission par voie digestive (Acha et Szyfres, 1989).

➤ **Contamination par Inhalation**

Inhalation de poussière de litière, d'aérosol contaminé dans un laboratoire, un abattoir ou encore dans une étable vide à cause de la transhumance (Pasteur Vallery-Radot et *al.*, 1963) (**Fig. 16**) .



**Figure 16:** Transmission par inhalation (Pasteur Vallery-Radot et *al.*, 1963)

➤ **Par inoculation**

Elle est accidentelle chez des vétérinaires et des chercheurs de laboratoire car la brucellose est l'une des maladies qui se contracte le plus facilement au laboratoire. (Bacha, 1989)

➤ **La transmission interhumaine:**

reste exceptionnelle et sans porter pratique (Henri et *al.*, 1967).mais il peut se transmettre par voie sanguine(transfusion sanguine) (Keinboun, 1982) puisque la *brucella*(agent pathogène de la brucellose)peut survivre un long temps sur les différents dérivés du sang et dans ses différentes températures de conservation.

### **III.6. Resistance (J. P. Ganiere, 1990)**

#### **III.6.1. Resistance Aux Agents Physiques**

Les *Brucella* résistent plusieurs semaines à plusieurs mois à température ordinaire. Elles survivent à la dessiccation, en particulier dans les milieux contenant des protéines (elles restent viables dans le sol ou la poussière pendant une période allant jusqu'à 10 semaines). Leur survie est prolongée à basse température (plusieurs années dans un tissu congelé).

Elles sont en revanche sensibles à la chaleur (destruction en quelques minutes à 62° C, destruction à température de pasteurisation, méthode U.H.T. par exemple) et aux radiations ionisantes aux doses stérilisantes normales.

### III.6.2 Resistance Aux Agents Chimiques

Les *Brucella* sont facilement détruites par la plupart des désinfectants usuels, en particulier le formaldéhyde en solution. Notons toutefois que la présence de matière organique réduit considérablement l'activité de ces désinfectants.

Un pH bas permet aussi leur inactivation : la fermentation est ainsi suffisante pour obtenir la destruction des *Brucella* dans les produits laitiers; on estime toutefois à au moins trois mois la période de maturation nécessaire pour éliminer de façon certaine tout risque de persistance de ces germes dans un fromage non cuit.

### III.6.3. Action Des Antibiotiques

In vivo leur multiplication intracellulaire et leur persistance durant de longues périodes à l'intérieur des cellules macrophagiques limitent les antibiotiques actifs sur *les brucella* à ceux ayant une bonne pénétration cellulaire. Les cyclines ; la rifampicine, le cotrimoxazole et les phénicoles répondent à ces deux critères. On utilise souvent une association doxycycline et rifampicine ou tétracycline et streptomycine ou encore le Gitrimoxazol (Fig. 17).



Figure 17: L'action des antibiotiques sur la *Brucella*

### III.7. Les symptômes et les lésions

Les symptômes et les lésions observés ne sont pas vraiment spécifiques, néanmoins on peut dire qu'ils s'apparentent étroitement à ceux de la brucellose bovine. Cependant ils se divisent en symptômes génitaux et symptômes extra génitaux.

#### III.7.1. Symptômes et lésions de l'appareil génital

##### ➤ Chez la femelle

**Avortement :** Le symptôme majeur de la brucellose chez l'espèce caprine et bovine est l'avortement qui se produit chez l'espèce caprine au cours du 3ème ou 4ème mois de gestation, (Derivaux et Ectors, 1986).

**Rétention placentaire :** La rétention placentaire est moins fréquente chez les caprins que chez les bovins. Elle peut toucher 10% des femelles dans un troupeau durant la première année d'infection. Une stérilité temporaire est habituelle chez cette espèce caprine, même en l'absence de rétention placentaire (Ganière, 2001).

**Mammite brucellique :** Chez la chèvre, la mammite peut être le premier signe qu'on remarque dans le troupeau (Derivaux et Ectors, 1986) et qui affecte de nombreux sujets. La mammite brucellique peut atteindre le stade clinique (contrairement aux bovins) avec formation de nodules inflammatoire ayant le volume d'une noix, associées à l'apparition d'un lait grumeleux. (Derivaux et Ectors, 1986). Cette inflammation mammaire donne lieu à des troubles purement fonctionnels liés à une inflammation des alvéoles et du tissu conjonctif inter-alvéolaire. Elle est marquée par une légère réduction de la reproduction lactée pouvant atteindre 10% (Toma, 2001).

**Métrites brucelliques :** Des lésions d'endométrites guérissent en quelques semaines. Elles peuvent être responsables d'infécondité temporaire et des complications infectieuses peuvent également se produire (Toma, 2001).

##### ➤ Chez le male

Chez le male, l'infection demeure généralement inapparente. Il est possible d'observer néanmoins des cas d'orchite, d'épididymite ou une baisse de fertilité avec une tuméfaction des

bourses, un épaissement de l'albuminée et l'augmentation du volume du testicule.

### **III.7.2. Symptômes et lésions extra génital:**

Toma, (2001) souligne que les lésions suppurées sont peu fréquentes (abcès superficiels ou profonds). Elles sont parfois associées à une inflammation des vésicules séminales (spermatocyste brucellique). D'autres symptômes ayant une localisation extra génitale peuvent être observés à savoir : des arthrites, des bursites, des spondylites et de l'hygroma.

Le diagnostic peut être fait par différentes méthodes immunologiques :

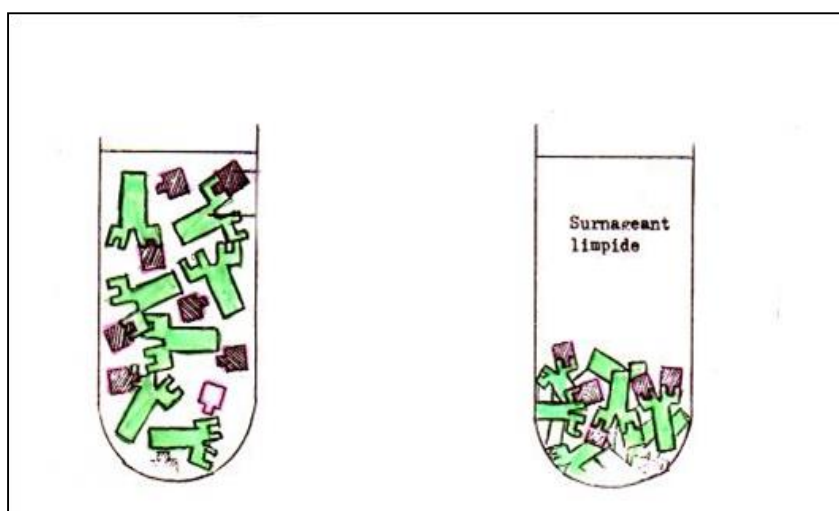
- Sérodiagnostic de Wright.
- épreuve de l'antigène tamponné (EAT).
- Immunofluorescence indirecte.
- Immuno-enzymologie (en développement) ou ELISA.

### IV.1. Sérodiagnostic de Wright (séro-agglutination en tube):

Consiste à rechercher chez le malade une éventuelle production de l'anticorps car les *Brucella* sont des bactéries qui poussent longtemps, et à rechercher des agglutinations d'une suspension de *Brucella* en présence de dilution du sérum. Le SDW ou séro-agglutination spécifique est le test le plus utilisé due à sa sensibilité, et sa réalisation simple. Il est spécifique pour les deux anticorps agglutinants (IgM puis IgG) et bloquants ; ainsi que a vu un résultat négatif impose la recherche des Anticorps bloquants (Ganière, 1990),.

Elle est positive 10-15 jours assez tôt durant la maladie (c'est la plus précoce) mais se négative vite (elle est positive surtout en phase aigüe). Un titre supérieur ou égale à 80 est significatif au résultat positif (Tableau 4).

Ne pas oublier de diluer le sérum « phénomène de zone ». Des faux positifs sont possibles (réaction croisée avec *Yersinia enterocolitica* ; *Vibrio cholerae* et *Francisella tularensis*) La possibilité de « faux négatifs » justifie la recherche systématique de l'anticorps bloquants apparaissant chez certains malades ; surtout en phase chronique ; ce sont des IgA ou IgG occupant les sites antigéniques sans provoquer de l'agglutination (**Fig. 18**). On ajoute au tube réactionnel une goutte de témoin positif : Si l'agglutination ne se produit pas c'est parce qu'elle est empêchée par les anticorps bloquants fixes sur les cellules des brucellas et elle est une réaction quantitative.



**Figure 18:** Le principe de test de sérodiagnostique de Wright(Ganière, 1990),.

**Tableau n°4:** Le seuil de positivité du test(Ganière, 1990),..

<b>Dilution</b>	<b>1/10</b>	<b>1/20</b>	<b>1/40</b>	<b>1/80</b>	<b>1/160</b>	<b>1/320</b>	<b>1/640</b>	<b>1/1280</b>	<b>1/2560</b>
<b>Titre</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>120</b>	<b>240</b>	<b>480</b>	<b>960</b>	<b>1920</b>	<b>3840</b>

Seuil de positivité

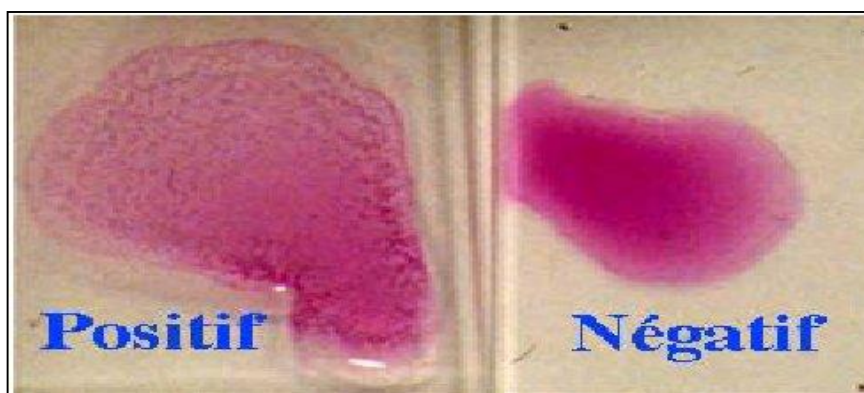
#### IV.2. Test au rose Bengale : Epreuve à l'antigène tamponné (E.A.T) (Card-test) :

D'après Alton et *al.* (1992), ce test constitue une épreuve de dépistage systématique chez l'animal (ovins, caprins, bovins) et chez l'homme. C'est un test Qualitatif. C'est une réaction rapide d'agglutination sur lame de sérum pur avec un antigène coloré à pH acide tamponné, mettant en évidence les IgG (Avril et *al.*, 1992).

C'est une suspension concentrée de *Brucella abortus* inactivée par la chaleur et le phénol (0.50 %), diluée en tampon acide et colorée par le rose Bengale, cet antigène est pour la recherche des anticorps (*Brucella melitensis*, *abortus* et *suis*) à pH égale à 3,65 plus ou moins 0.05 pour éliminer les agglutinations non spécifiques (Avril et *al.*, 1992).

On applique sur une plaque ou une carte à surface plane. On mélange une goutte de ml de sérum à tester avec une goutte d'antigène coloré au rose Bengale (Alton et *al.*, 1992), suivi d'une agitation soigneuse pendant 4 minutes. La lecture se fait immédiatement après les quatre

minutes sous un bon éclairage et à l'œil nu. Selon Rahal et *al.* (1998), la présence d'une agglutination même minime est considérée comme réaction positive (**Fig. 19**)



**Figure 19:** Le témoin négatif et témoin positif du test rose Bengale(Alton et *al.*, 1992),

### IV.3. Réaction de fixation du complément

C'est un test sensible et spécifique donc qualitatif, Seule l'espèce bovine fait l'objet de la FC et tout bovin présentant un seuil de positivité  $\geq 20$  U CEE implique son abattage.

Le complément : Est un ensemble hétérogène de glycoprotéines sériques, ses rôles sont :

- ✓ Moyen de lutte contre les agents infectieux,
- ✓ Lyse des bactéries,

Son activation est stimulée par le complexe antigène/Anticorps, sa mise en œuvre est délicate, la réaction de fixation du complément met en évidence les IgG, elle aussi, plus tardivement positive et reste plus longtemps positive. Cependant cette réaction peut être faussement positive dans les mêmes circonstances que le sérodiagnostic de Wright (Jean-loup avril, 1991).

- **Principe :**

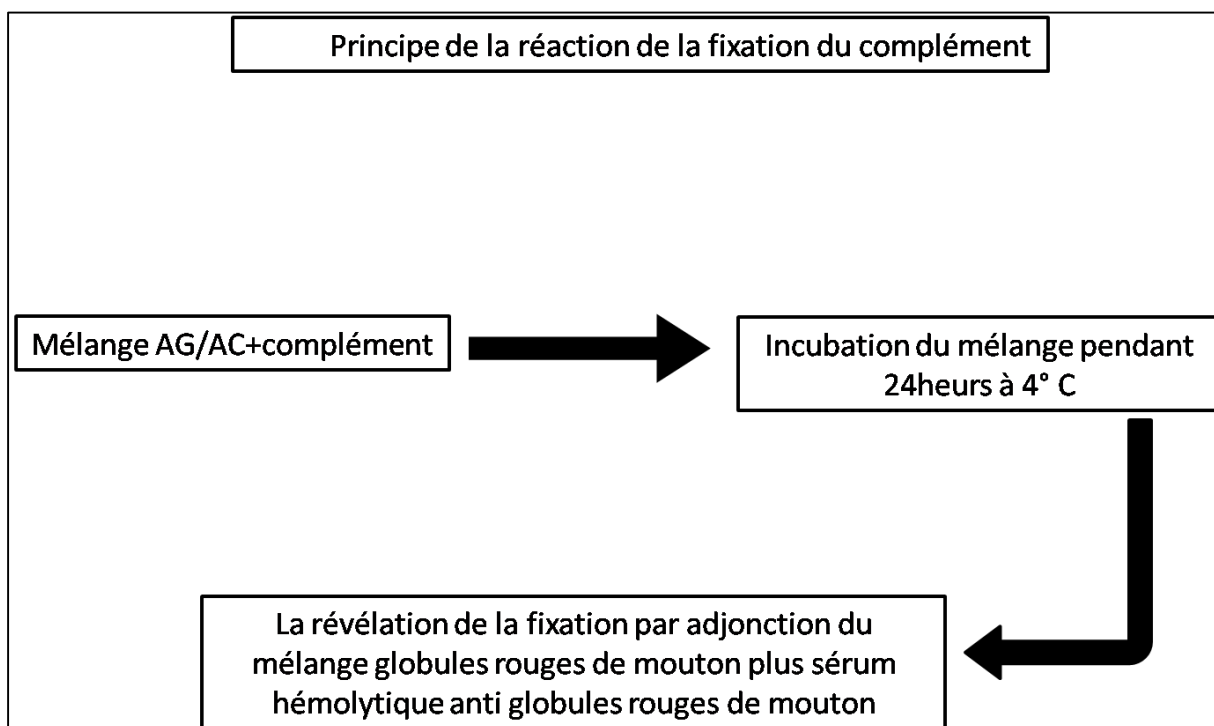
Lorsque le complément se fixe à un complexe antigène-anticorps(**Fig. 20**), il est« consommé ». Les tests de fixation du complément sont très sensibles et peuvent être utilisés pour détecter des quantités très faibles d'un anticorps contre un micro-organisme dans un sérum de patient. Un antigène connu est mélangé avec le sérum à tester dépourvu de

compliment. Après le temps nécessaire pour former les complexes immuns, on ajoute du complément au mélange. Si des complexes immunes sont présents, ils fixeront et consommeront le complément.

En suite, des cellules indicatrices sensibilisées sont ajoutées au mélange il s'agit généralement de globules rouges de mouton tapissés au préalable avec des anticorps fixant le complément. Si il n'y a pas de complexe immune formé parce qu'il n'y a pas d'anticorps dans le sérum, la lyse des cellules indicatrices se produit (Fig. 21).

En l'absence d'anticorps, le complément reste et la lyse indicatrice, d'autre part, s'il y a des anticorps spécifiques dans le sérum à tester et que le complément est fixé par les complexes immuns. Les quantités de complément restantes sont insuffisantes pour lyser les cellules indicatrices (Tableau 5). L'absence de lyse montre donc la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum à tester.

- Moins de 50% d'inhibition de l'hémolyse à la dilution  $\frac{1}{4}$ = NEGATIF.
- 50% ou plus d'inhibition de l'hémolyse à la dilution  $\frac{1}{4}$ =POSITIF.



**Figure 20:** Le principe de test de fixation du complément(Jean-loup avril, 1991).

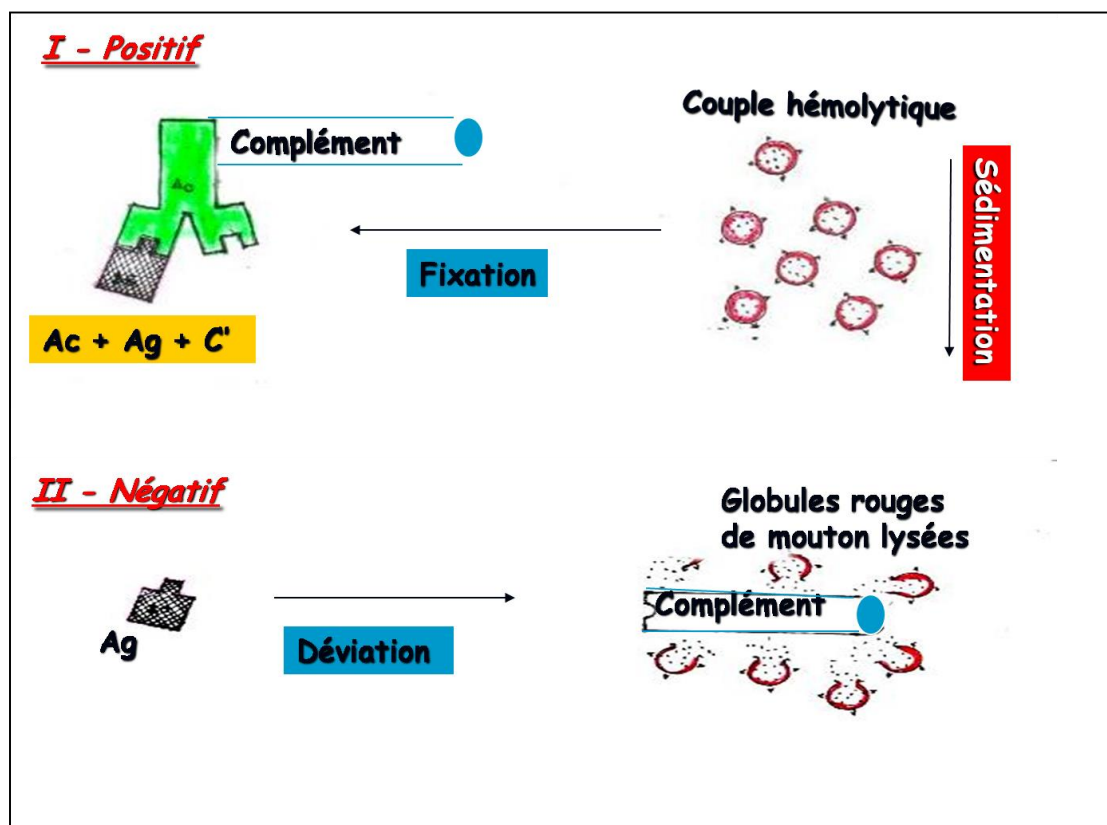


Figure 21: Lecture du test de fixation du complément(Jean-loup avril, 1991).

Tableau 5: Le seuil de positivité de test de fixation de complément(Jean-loup avril, 1991)..

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

Seuil de positivité

**IV.4. Technique d'Elisa (Enzyme linked immunosorbant Assay):**

Le test ELISA est une technique immunoenzymatique permettant de visualiser une réaction antigène-anticorps (Bachir, Pacha, 1990)..

Le principe de cette technique est fondé sur l'utilisation d'antigène ou d'anticorps marqué par une enzyme capable d'agir sur un substrat induisant ainsi l'apparition d'une coloration mesurable (Bachir, Pacha, 1990).

C'est un test sensible qui peut être pratiqué sur le lait et le sérum (Ganière, 1990). Il peut être utilisé dans les procédures de dépistage ou comme un test de confirmation.

## I. Objectifs:

L'objectif de cette étude qui a été faite durant les deux mois de Mars et Avril de l'année 2012 au centre de transfusion sanguine de Laghouat et au Laboratoire Vétérinaire Régionale de Laghouat ; est d'évaluer l'opportunité de l'introduction systématique du dépistage de la brucellose lors du contrôle du sang des donneurs.

## II. Matériels et méthodes

### II.1 Matériels:

#### II.1.1. Matériel biologique :

L'étude a été faite sur 159 donneurs au niveau du centre de transfusion sanguine de Laghouat. Les 159 donneurs ont été choisis après avoir subis une sélection médicale afin d'exclure les sujets qui n'ont pas les critères d'admission (l'âge, poids, tension artérielle ..... ) (Tableau 6) et pour limiter le plus possible le nombre des donneurs à risque (alcoolique, drogue, notion de voyage dans les régions endémiques : paludisme, brucellose....etc.).

**Tableau 6:** Répartition des échantillons de l'étude selon le sexe, l'âge et le groupe sanguin:

Nombre de donneurs	AGE			SEXE		GS							
	18/30	30/40	40/65	Femme	Homme	A+	A-	O+	O-	B+	B-	AB+	AB-
159	90	50	19	15	144	32	03	83	12	21	02	04	02

## **II.1.2. Matériels non biologique :**

### **II.1.2.1. Les réactifs :**

Les réactifs de la méthode ELISA laboratoire EXPERT pour la détection des anticorps anti-HIV les anticorps anti-HCV, les antigènes anti-HBs et les anticorps anti *Tréponima palludium*.

Les Tests rapides (bandelettes) HIV, HCV, HBs et TP laboratoire ACON.

## **II.2. Méthodes :**

### **II.2.1 dépistage des paramètres systématiques:**

Le dépistage des maladies de HIV, hépatite B, hépatite C et la syphilis ce fait dans le centre de transfusion sanguine par deux tests les tests immuno-enzymatiques et les tests rapides (bandelettes) durant le travail il ya 155 échantillon ont été contrôlés par les tests ELISA et les 4 autres échantillons ont été contrôlés par les tests rapides (bandelettes).

#### **II.2.1.1 Les tests immuno-enzymatiques :**

Ce sont des techniques appliquées à la recherche d'antigène ou d'anticorps dans le plasma ou le sérum humain (voir partie bibliographique), le contrôle a été fait par des tests immuno enzymatiques type ELISA SANDWICH pour la détection des anticorps anti-HIV, anti-HCV, anti-AgHBS et anti TP. Le changement de la couleur de la cupule en bleu indique une réaction positive. Alors que si la couleur reste transparente indique une réaction négative.

L'apparition de la couleur bleu dans le test ELISA est la preuve de la formation de la chaine Ag-Ac-Ag ou Ac-Ag-Ac puisque c'est un ELISA SANDWITCH donc la réaction immunologique Ag-Ac est traduite par réaction colorée grâce à l'enzyme.

**i) Protocole de contrôle de virus du Sida (laboratoire EXPERT)**

On prend 100 µl de sérum et de contrôle positif et négatif sont distribués dans les cupules, ensuite les cupules sont recouvertes par un couvercle et incubées pendant 30 min à 37°C, après l'incubation la plaque est lavée, puis 100 µl de conjugué est ajouté immédiatement dans chaque cupule, la plaque est recouverte et incubée encore pendant 30 min à 37 °C, après l'incubation la plaque est lavée puis on ajoute 50 µl de chromogène A plus 50 µl de chromogène B dans chaque cupule ensuite la plaque est encore recouverte et incubée à 37 °C pendant 15 min et enfin 50 µl de solution de stop (l'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> 2M) est additionné.

**Lecture des résultats:**

La densité optique est lue à 450 nm dans les 30 min après l'addition de solution de stop en utilisant une longueur d'onde de référence 620 à 690 nm.

Avant de mettre les échantillons en ordre il faut respecter un certain ordre:

- 1- dans les cupules A, B et C pour le contrôle négatif.
- 2- dans les cupules D et E pour le contrôle positif.
- 3- dans les autres cupules on met les échantillons à tester.

**Validation du test :**

La moyenne de la densité optique des contrôles négatifs est inférieure ou égale à 0.1. La moyenne de la densité optique des contrôles positifs est supérieure ou égale à 0.8.

**Calcul de la valeur seuil et interprétation des résultats :****a)-Calcul des résultats:**

- 1-Contrôle négative: on calcul la densité optique des contrôles négatifs.

2-Valeur seuil:  $VS=0.125+NC$  ou NC est la moyenne des densités optiques des contrôles négatifs.

Remarque : Si le NC est inférieur a 0.05 on la prend 0.05.

#### **b)-interprétation des résultats:**

Si la valeur de la densité optique du donneur est inférieure à la valeur seuil le résultat est considéré négatif. Si les échantillons ayant une densité optique supérieure ou égale à la valeur seuil sont considérés comme initialement positifs dans le test de tels échantillons doivent être analysés en double en utilisant l'échantillon d'origine et si le résultat est encore positif la présence des anticorps anti HIV doit être confirmée par d'autres tests appelés tests de confirmation.

Ces derniers doivent obligatoirement être réalisés sur un second prélèvement.ils concernent essentiellement les infections à HIV et les hépatites B et C et sont basés sur les réactions de Western Blot et Immuno Blot pour HIV, immuno Blot pour l'hépatite C, séro-neutralisation de l'Ag HBS pour l'hépatite B et la PCR pour les trois précédents.

Exemple de calcul d'après une plaque lus par la densité optique:  $VS=NC+0.125$  ;  $NC=0.187+0.170$  ;  $VS=0.178+0.125$  on aura donc 0.303 comme valeur seuil. La densité optique supérieur a la valeur seuil est expliqué par la présence des molécules protéiques (virus) puisque les protéines absorbent dans ce domaine des longueurs d'onde donc c'est la preuve d'existence des molécules virales correspondantes.

#### **ii) Protocole de contrôle de l'hépatite C (laboratoire EXPERT)**

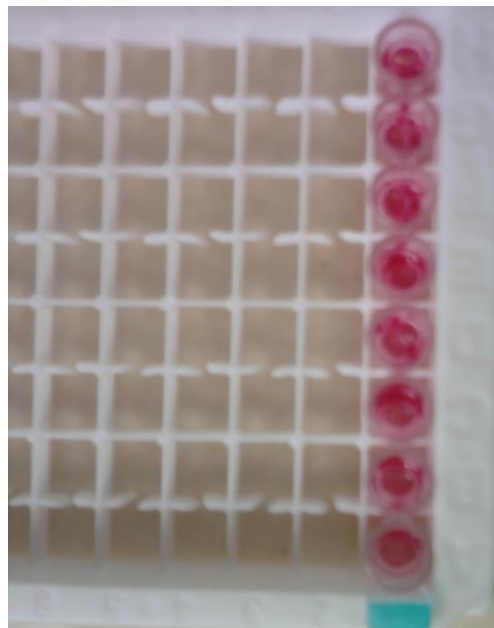
On respecte le même ordre de présentation des cupules.

On prend 100 µl de diluant et 10 µl de sérum sont distribuées dans les cupules respectivement ensuite la plaque est recouverte et incubée a 37 °C pendant 30 min puis on lave la plaque, après on ajoute 100 µl de conjugué dans chaque cupule puis on incube la plaque a 37 °C pendant 30 min, la plaque est ensuite lavée, après l'incubation 50 µl de substrat A et 50 µl de substrat B sont additionnées respectivement immédiatement dans chaque cupule

on incube encore la plaque toujours a 37 °C pendant 20 min et enfin 50 µl de solution de stop est met dans chaque cupule.

**Lecture des résultats:**

La lecture se fait après au moins 30 min à une densité optique de 450 nm en utilisant une longueur d'onde de référence 620 à 690 nm.



**Figure 22:** Photo représentant la microplaque contient des cupules traitées (photo personnelle).



**Figure 23:** Le lecteur de microplaque et l'imprimante du lecteur (photo personnelle).

### **Calcul et interprétions des résultats:**

#### **a)-Calcul des résultats:**

1- Contrôle négatif: si les contrôles sont utilisés en double on calcul la moyenne on exclut toute négatif supérieur à 0.25.

2- Valeur seuil: on calcule la valeur seuil en ajoutant 0.6 à la moyenne des du contrôle négatif .

#### **b)-interprétation des résultats:**

1- Résultats réactifs: les échantillons présentant une densité optique supérieur à la valeur seuil sont considérés comme initialement réactifs et doivent être analysés en double en utilisant l'échantillon d'origine. Les échantillons réactifs pour au moins une des ré-analyses sont présumés contenir des anticorps dirigés contre les antigènes du HCV et la présence de ces derniers devrait être confirmée par d'autres test (ImmunoBlot pour l'hépatite C).

2- Résultats non réactifs: les échantillons présentant une densité optique inférieure à la valeur seuil sont considérés comme négatif dans le test.

**iii)- protocole de contrôle de l'hépatite B (laboratoire EXPERT):**

On prend 50 µl de sérum et 50 µl de conjugué sont distribués respectivement dans les cupules respectant toujours le même ordre de contrôle positif et négatif, la plaque est ensuite recouverte et incubée à 37 °C pendant 60 min (une heure), puis on lave la plaque après 50 µl de chromogène A (substrat) et 50 µl de chromogène B sont respectivement additionnées dans chaque cupule, la plaque est encore recouverte et incubée à 37 °C pendant 15 min ensuite de solution de stop est distribué dans toutes les cupules sa raison de 50 µl.

**Lecture des résultats:**

La lecture se fait 30 min au minimum après l'ajout de la solution d'arrêt à une densité optique de 450 nm en utilisant une longueur d'onde de référence 620 à 690 nm.

**Calcul et interprétation des résultats:**

**a)-calcul des résultats**

1-contrôle négatif: on calcul la densité optique moyenne des contrôles négatifs. Si l'une des cupules contenant le contrôle négatif présente une DO supérieure de plus de 0.03 à celle des autres on élimine la valeur supérieure.

2-valeur seuil: la valeur seuil est calculée en ajoutant 0.05 à la moyenne du contrôle négatif.

**b)-interprétation des résultats:**

1-résultats non réactifs: les échantillons ayant une densité optique inférieure à la valeur seuil sont considérés comme non réactifs dans le test.

2-résultat réactifs: les échantillons présentant une densité optique supérieure à la valeur seuil sont considérés comme initialement réactifs et doivent être re-analysés en double (en utilisant l'échantillon d'origine par Sero-neutralisation de l'Ag HBs pour l'hépatite B).

**iii) Protocole de contrôle de la syphilis (laboratoire EXPERT):**

On prend 50 µl de sérum et 50 µl de conjugué sont distribués respectivement dans les cupules, la plaque est ensuite recouverte et incubée a 37 °C pendant 60 min, puis on lave la plaque ,ensuite 50 µl de substrat A et 50 µl de substrat B sont additionnées dans chaque cupule, après la plaque est recouverte et incubée a 37 °C pendant 15 min, a la fin d'incubation 50 µl de solution de stop est ajouté dans toutes les cupules.

**Lecture des résultats:**

La lecture se fait après au moins 30 min a une densité optique de 450 nm en utilisant une longueur d'onde de référence 620 à 690 nm.

**Calcul et interprétation des résultats:****a)-Calcul des résultats**

1- Contrôle négatif: on calcul la densité optique moyenne des contrôles négatifs. Si l'une des cupules

2- Valeur seuil: la valeur seuil est calculée en ajoutant 0.02 à la moyenne du contrôle négatif.

**b)-interprétation des résultats:**

1-résultats non réactifs: les échantillons ayant une densité optique inférieure à la valeur seuil sont considérés comme non réactifs dans le test.

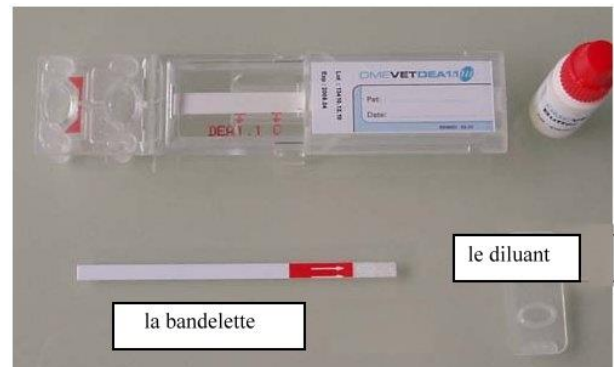
2-résultat réactifs: les échantillons présentant une densité optique supérieure à la valeur seuil sont considérés comme initialement réactifs et doivent être re-analysés en double (en utilisant l'échantillon d'origine par Séroneutralisation de l'Ag HBs pour l'hépatite B).

### II.2.1.2 Tests rapides (les bandelettes):

On dispose une goutte de sérum du patient dans la bandelette ou on introduit la bandelette elle même dans le tube qui contient le sérum du patient puis on ajoute une goutte de diluant pour faciliter la migration.



**A:** l'emballage des bandelettes



**b:** la bandelette et son diluant

**Figure 24 :** Photos du kit de bandelettes (photos personnelles)

Résultats réactifs: l'apparition de trait de positivité et le trait de contrôle est significative de résultat positif.

Résultats non réactifs: s'il ya pas apparition de trait de positivité et seulement le trait de contrôle qui apparaît donc résultats négatif.

L'apparition de trait de positivité est expliqué par la formation de la chaîne Ag-Ac dans cette zone qui contient l'Ag ou l'Ac traduite par une couleur puisque est une méthode immunochromatographique et donc séparé l'Ac ou l'Ag contient dans le sérum du patient qui sera retenu par l'Ac ou l'Ag trouvé dans la zone de positivité.

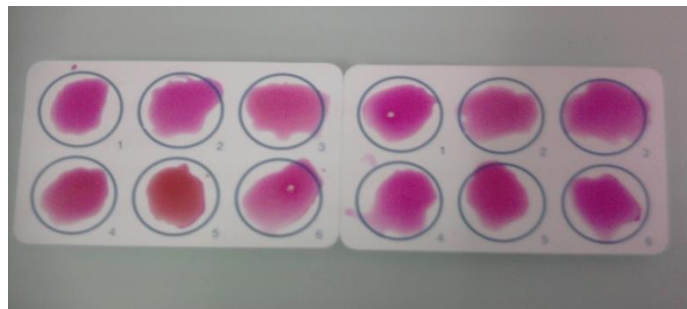


**Figure 25:** Dépôt de goutte de sérum dans la bandelette (photo personnelle).

## II-2.2. Les Tests de dépistage de brucellose:

### II.2.2.1 Le rose Bengale: (E.A.T):

Placer l'antigène et le sérum a température 21°C plus ou moins 5 °C de 30 à 60 min avant le début de test. Sur une plaque ou une carte à surface plane on met 50 µl de sérum et une goutte de l'antigène coloré au rose Bengale puis on mélange la goutte avec le sérum et on agite la plaque a l'aide d'un agitateur pendant 4 min.



**Figure 26:** Le test de rose Bengale (photo personnelle)

- 1- Résultats positif: s'il ya une agglutination donc considéré comme résultat positif.
- 2- Résultats négatifs: s'il ya pas apparition d'une réaction d'agglutination donc le résultat est négatif.

La réaction d'agglutination s'explique par la formation d'une réaction immunologique Ag-Ac.

### II.2.2.2 Le sèro-diagnostique de Wright (séro-agglutination en tube):

#### Mode opératoire:

10 tubes en verre sont distribués dans un portoir. On met dans le premier tube (solution mère) 2 ml de l'eau physiologique puis on remet 100 µl de tube même et en le remplace par 100 µl de sérum à tester (1 volume pour 19 volume de diluant) c'est-à-dire dilution 1/20. Ensuite on distribue 1 ml de l'eau physiologique dans les autres tubes. Puis a l'aide d'une pipette de 1 ml on prend 1 ml de solution mère et on le met dans le 2 ème tube la même

opération est répétée jusqu'à le dernier tube et le dernier ml est rejeté ,comme ça on aura les dilutions 1/20,1/40,1/80,1/160 ainsi de suite. les tubes sont ensuite recouverts par le coton cardé et incubés à 37 °C pendant 24 H.

### **Lecture :**

Sans agiter noter l'importance de la clarification du surnageant Culot au fond du tube sous forme de bouton et donc le liquide est hétérogène une phase transparente et un bouton au fond de tube a partir de dilution de 1/80. Le titre d'un sérum correspond à la plus haute dilution montrant un surnageant claire et homogène.

La formation de bouton au fond du tube s'explique par la formation de la réaction Ag-Ac et grâce à la densité élevée de ce complexe il précipite au fond de tube, et s'il n'ya pas de complexe immunologique Ag-Ac le liquide qui ce contient dans le tube reste dans le même aspect homogène avec la couleur bleu de l-antigène qu'on ajouté.

### **II.2.2.3 La fixation du complément:**

Le sérum à tester est mit dans une température de 57 °C à raison de détruire son complément (décomplémenter le sérum). Sur une microplaque qui contient des cupules, 25 µl de sérum et 75 µl de tampon vironal sont distribués dans chaque cupule (1 volume de sérum pour 4 volume diluant) dilution 1/4avec toujours des témoins positifs et négatifs, puis on prend 25 µl de première cupule et on le met dans la 2 éme cupule puis 25 µl de 2 éme cupule et le met dans la 3éme cupule ainsi de suite jusqu'à la dernière cupule et la dernière 25 µl on la rejeté.

On fait aussi des témoins antigène avec 25 µl de l'antigène dilué plus 25 µl de tampon vironal plus 285 µl de complément.

Des témoins de compléments sont aussi faits par 25 µl de complément plus 50 µl de tampon.

Le dernier témoin est les témoins des hématies 75 µl hématies (ces trois témoins sont fait dans des cupules a coté un peu loin des sérums à tester). Enfin 50 µl de l'antigène et 50 µl de

complément sont distribués dans toutes les cupules. La microplaque est ensuite incubée à +4 °C pendant une nuit. Après l'incubation on ajoute le complexe hématie-anti hématie à raison de 50 µl, puis on réincube la microplaque dans un étuve a 37°C pd 30 min.

Préparation des réactifs (voir annexe II)

**Lecture:**

1- Résultat positif: s'il ya une précipitation des hématies au fond de la cupule on le considère comme positif.

2- Résultat négatif: s'il ya pas précipitation des hématies ajoutés et donc la couleur de liquide est rouge le résultat est déclaré négatif.

**I. Résultats**

**I.1 Les résultats des paramètres systématiques:**

**I.1.1 La détection de maladies de HIV:** Dans nos échantillons on n'a pas trouvé de cas séropositif de HIV. (Tableau 07).

**I.1.2 La détection de maladies de l'hépatite C:** Dans l'ensemble des 159 cas étudiés on a trouvé un seul cas séropositif au HCV (Tableau 7).

**I.1.3 La détection de maladie de l'hépatite B:** Les tests effectués sur 159 donneurs ne montrent aucun cas de séropositivité à ce marqueur (Tableau 7).

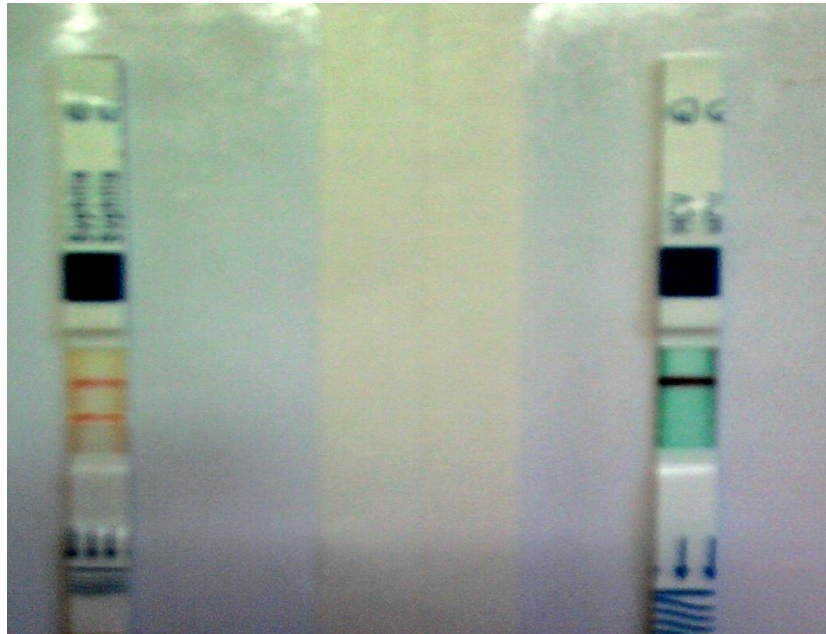
**I.1.4 La détection de maladie de la syphilis:** Parmi nos échantillons un seul cas séropositif à la syphilis a été dépisté (Tableau 7).

**Tableau 7: Résultats du contrôle sérologique:**

	HIV		HBs		HCV		TP	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Test Elisa	0	-	0	-	1	0.62	1	0.62
Test rapide	0	-	0	-	0	-	0	-

**I.1.5. Les tests rapides (bandelettes):**

**Bandelettes HIV, HCV, HBs et TP:** Les tests effectués sur 4 donneurs montrent l'absence des antigènes de ces marqueurs (Fig. 27) (Tableau 7).



**Figure 27:** L'aspect de positivité de test rapide (bandelettes) (photo personnelle)

## **I.2. Les résultats de la brucellose:**

### **I.2.1 Le rose Bengale:**

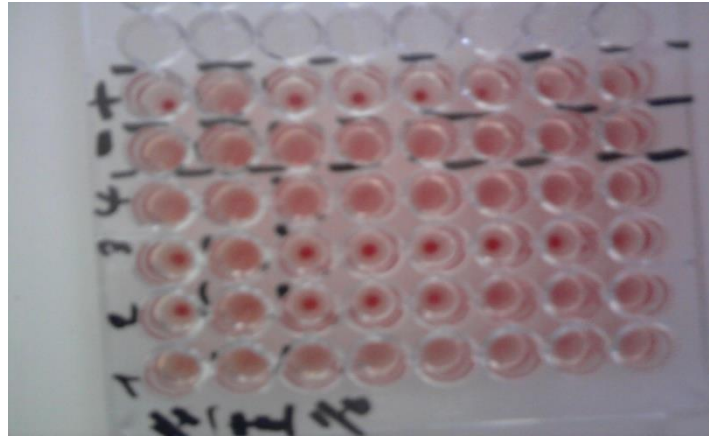
Dans l'ensemble des 159 cas étudiés on a trouvés 10 cas séropositifs de rose Bengale, donc ces 10 cas sont confirmés par le test de séro-diagnostic de Wright qui a été réalisé dans le centre de transfusion sanguine de Laghouat et le deuxième test de fixation du complément qui a été réalisé dans le laboratoire vétérinaire régional de Laghouat.

### **I.2.2 Séro-diagnostic de Wright:**

Dans l'ensemble de 10 cas étudiés on a trouvé 08 cas qui ont un résultat positif de ce test.

### **I.2.3 Fixation du complément:**

Parmi nos 10 échantillons on a 07 cas qui ont des résultats positifs de fixation de complément (Fig. 28).



**Figure 28:** Les résultats de test de fixation du complément (photo personnelle).

### **I.3. Données statistiques:**

D'après le service de la prévention de Laghouat on a les résultats statistiques de la brucellose dans la Wilaya de Laghouat dans la période 1994-2011. C'est données statistiques sont représentées dans la partie Annexe (figure I , figure II, figure III et tableau I).

**II. Discussion:**

Nous avons traité la séroprévalence des donneurs du sang durant les deux mois Mars et Avril 2012. L'étude sérologique s'est déroulée au sein du centre de transfusion sanguine de Laghouat. Sachant que notre Wilaya comporte des foyers brucelliques, mais le taux d'infection varie d'une zone à une autre. Nous avons étudié au total 159 donneurs du sang pour l'ensemble de toute la Wilaya de Laghouat.

Pour le mois de Mars, sur les quatre-vingt cinq (85) échantillons dépistés, six (6) ont été positifs ; et pour le mois d'Avril, sur les soixante quatorze (74) échantillons dépistés, 4 cas ont été positifs. Les 159 échantillons étudiés sont tirés de façon aléatoire.

Le dépistage de la brucellose par la méthode du rose Bengale a donné 10 cas positifs, donc une séroprévalence de 6,28 %. Selon des études faites en Europe en 2003, les résultats de dépistage sérologique de la brucellose donnent un taux de 3.74 % chez les donneurs du sang (Pebert, 2003).

Pour ces 10 cas positifs par le Rose Bengale, 8 cas sont révélés positifs par le sérodiagnostic de Wrihgt et 7 cas sont révélés positifs par la méthode de Fixation du complément selon le tableau 8.

**Tableau8:** Les résultats des tests de dépistage de la brucellose.

	Rose Bengale	Test de Wright	FC
159	10 (+)		
10 (+)		8 (+)	
10 (+)			7 (+)

Cet écart pourrait être expliqué par un titre infectieux à la limite inférieure du positif (phénomène de dilution) ; un similaire écart a été signalé par Ewalt et Bricker(2000) en France dans leur étude sur les bovins (méthodes de fixation de complément et le rose bengale). Prenant en considération que cette maladie est une zoonose et donc proportionnellement liée au taux de brucellose animale, ces résultats pourraient trouver explication dans les statistiques délivrées par la DSA de la Wilaya de Laghouat pour la période comprise entre 2000-2011 (voir tableau II en annexe).

Les donneurs dépistés positifs pour la brucellose étaient asymptomatiques pour cette affection au moment du don ; ceci pourrait être expliqué par la période d'incubation de brucellose qui est entre 1 et 4 semaines pouvant aller jusqu'à 6 semaines (Domennech et *al.*, 1980) et aussi au caractère intermittent de la fièvre brucellique quand la maladie est symptomatique (puisque la température pour la brucellose s'élève juste le soir de la journée et la nuit donc ne peut pas apparaître au moment du don de sang) (Henri et *al.*, 1967).

D'après Domennech et *al.* (1980), un sujet brucellique ne peut pas donner son sang qu'après 2 ans de la maladie vue que les Anticorps restent longtemps dans le corps humain.

De plus, la bactérie responsable de la brucellose résiste aux différentes températures de conservation des constituants du sang à savoir : 4 °C pour le culot globulaire, 34 à 37°C pour les plaquettes et -4°C pour le plasma (Keinboun, 1982).

En fin, un seul donneur peut infecter trois receveurs du sang puisque le sang du donneur est séparé en trois poches (culot globulaire, plaquettes et plasma) , donc ces résultats constituent un grand risque de contamination des receveurs du sang puisque ce dernier est considéré comme mode de contamination (Keinboun, 1982).

La brucellose est une maladie contagieuse qui peut affecter plusieurs espèces animale. Elle est causée par plusieurs espèces de *Brucella*. La bactérie est transmise à l'homme soit en consommant le lait et les produits laitiers contaminés soit par voie directe par contact quand des blessures entre en contact avec un animal infecté. D'autres modes de transmission sont possibles surtout en cas d'absence des contrôles systématiques des échantillons du sang transfusé au niveau de l'hôpital- CTS à savoir contact sang homme-homme. Le sang transfusé subi un dépistage de VIH, HBs, HCV et de *Treponema pallidum* mais pas la brucellose. La présence de *Brucella* dans le sang transfusé est un souci pour les personnes receveuses du sang et les autorités concernées. Dans ce contexte d'évaluer la prévalence de *Brucella* chez les donneurs du sang de la région de Laghouat, nous nous sommes rapprochés du Centre de transfusion sanguine CTS de l'hôpital de Laghouat Ahmida Ben Adjila afin étudier la prévalence de brucellose. Au total 159 échantillons du sang ont été étudiés, parmi ces échantillons, 10, 8 et 7 cas sont jugés positifs après la réalisation des tests ; du rose Bengale, du sérodiagnostic de Wright et de la méthode de fixation du complément, respectivement. Le présent bilan signifie une séroprévalence de 6,23% de la brucellose jugé comme taux élevé.

Parmi les problèmes rencontrés dans notre wilaya on peut citer : la non disponibilité des médicaments, sachant que la Rifampicine (traitement le plus efficace associé à la Doxycycline) est délivrée dans le cadre du traitement de la Tuberculose, la fréquence des complications en particulier Ostéo-articulaires nécessitant un traitement de longue durée allant jusqu'à 6 mois, l'importance du coût du traitement allant de 7000 DA pour les cas non compliqués et jusqu'à 30.000 DA pour les cas compliqués avec prise en charge en milieu Hospitalier et la majorité des cas de brucellose sont d'origine Caprine (Chèvre), cela pose un problème pour les vétérinaires, notamment nombre élevé de cette espèce et l'élevage à domicile non déclaré.

L'existence de la brucellose chez les Ovins est certaine mais pas évaluée par l'absence d'indemnisation, favorisant la présence d'un Réservoir animal non négligeable et incontrôlable.

Pour cela, il nous paraît intéressant comme perspective d'introduire le dépistage de la brucellose comme un paramètre systématique lors des tests avant de transfuser le sang surtout pour les pays endémiques de cette maladie puisque la majorité des gens atteints par la fièvre de Malte qui survient dans ces régions endémiques consomment le lait et ses dérivés à l'état

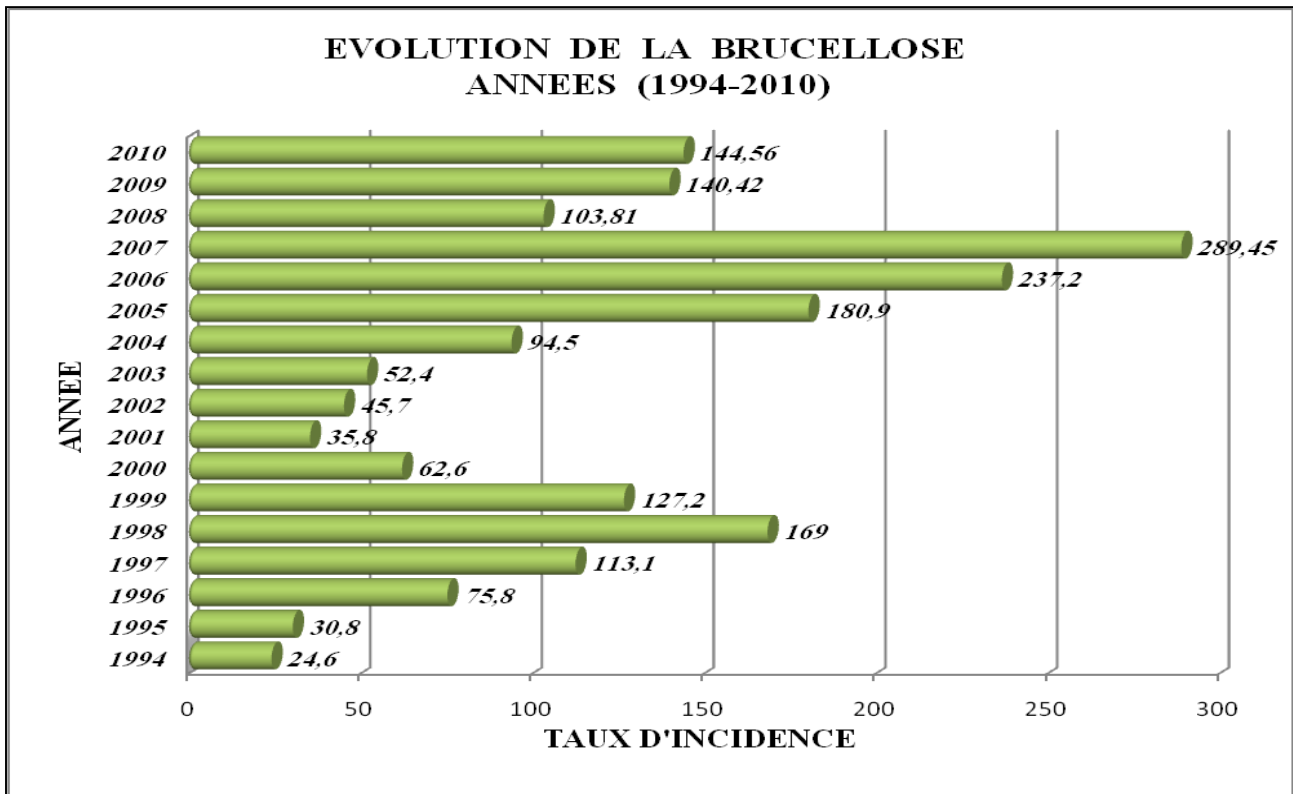
frais (sans pasteurisation, sans stérilisation....etc.) et car ce dernier est le mode principale de contamination de la maladie. Il est souhaitable de continuer cette étude à différente période de l'année et sur un nombre large des donneurs pour pouvoir confirmer l'opportune d'introduire le test de dépistage de la brucellose lors du contrôle du sang des donneurs.

- Académie. Edition et diffusion, Belgique 1986, P : 962.
- Acha P.N et Szyfres.B (1989) : Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, 2<sup>ème</sup> édition, P : 296-304.
- AFSSA : Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé :
- Agence National du sang ,2004.La transfusion sanguine en Algerie.
- ALTON.GG, Jones. LM, Angers Rd, Verger. TM (1992) : techniques for the brucellosis laboratory, P 34 – INRA, Paris 1988.
- Amine Khodja (1987) : l'immunité brucellique et le dépistage sérologique, Toulouse, rapport de stage France, 1987 P, 32-37.
- Anonyme (1964) : le 4<sup>ème</sup> rapport du comité FAO / OMS d'experts de la brucellose P : 16-18.
- Anonyme (1971) : le 5<sup>ème</sup> rapport du comité FAO / OMS d'experts de la brucellose
- Anonyme (1977) : le 6<sup>ème</sup> rapport du comité FAO / OMS d'experts de la brucellose
- Anonyme (1981) : la brucellose, chaire des maladies contagieuses, P 2-10 (ENV LYON )
- Anonyme (1982) : la brucellose, centre pour le contrôle des maladies des Etats Unis 1982.
- Anonyme (1994) : Brucellose animale et humaine dans l'Ouest Algérien (Algérie) 1994 P 7-12.
- Anonyme (2001) : Guide de l'investigation d'épidémiologie, Institut de veille sanitaire.
- Anonyme (2002) : Bulletin sanitaire vétérinaire année 2002. Direction des services
- Aubry. P (2002) la brucellose – fièvre de Malte, 2002 [www.medicinetropicale.com](http://www.medicinetropicale.com)
- Avril, J.L (1977) : Nouveau dictionnaire pratique de bactériologie clinique, édition Ellipes P 26-27.
- Avril, J.L, Debernat.H, Denis.F, Monteil.H (1992) Bactériologie clinique, 2<sup>ème</sup> édition
- Bacha – Djaffar (1989) : La Brucellose , éléments de prophylaxie des maladies
- Bachir – Pacha (1990) : Aspect cliniques et thérapeutique, séminaire sur la brucellose P 29, 31-32.
- Benelmoufok-A, Cherif.A, Taril.M (1984) : La Brucellose bovine en Algérie, dépistage de1969 à 1982 et analyse des résultats. Dév-Biol-Stand 1984, P : 699-709.
- Benhassine.S et Djellouli (2003) : la brucellose bovine dans les wilayas de

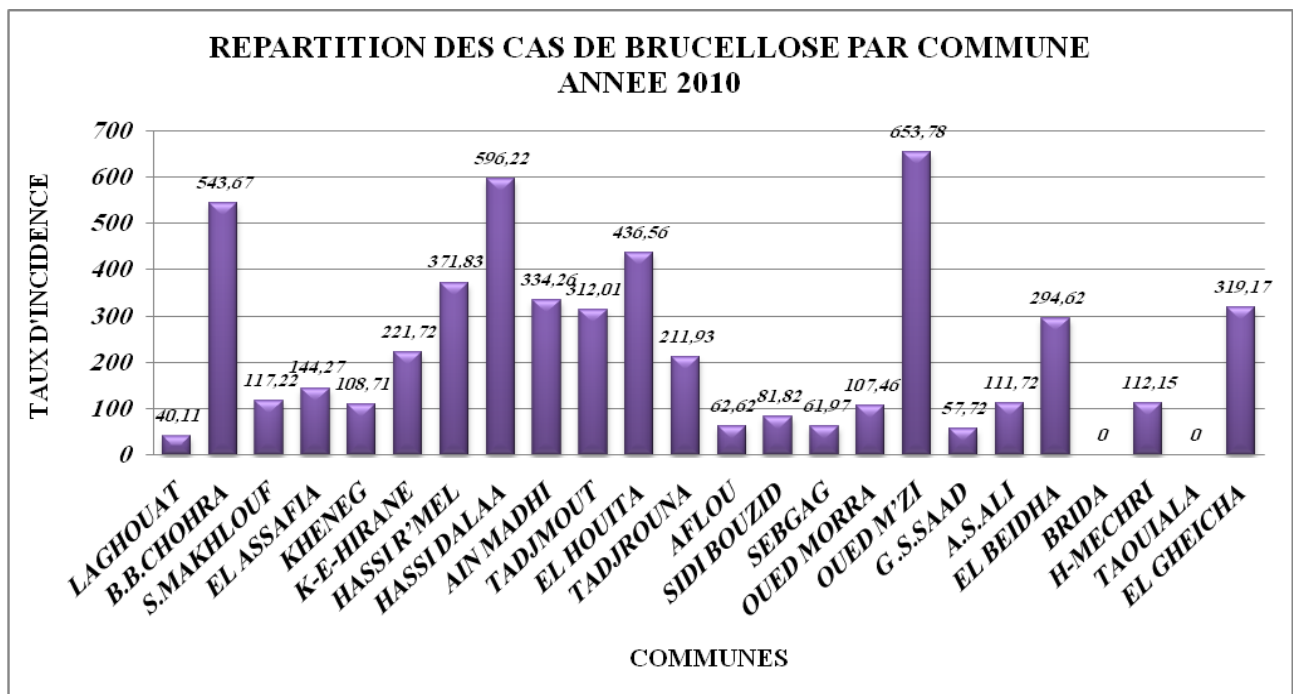
- Laghouat, Djelfa et Blida, impact sur l'homme. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études supérieures(D E S) en biologie.
- Bertrand.A (1981) : la brucellose – encyclopédie. Médico-chirurgicale (Paris n° 8038A<sub>10</sub> Franc (1981).
  - Bertrand.A (1981) : traitement des maladies infectieuses, édition Flammarion, P 238-240.
  - Blood-DC et Anderson-Ja (1973) : Médecine vétérinaire, P 426-444.
  - Boudilmi-B, Benhabyles.N (1981) : Epidémiologie de la brucellose animale et humaine, Calas,A; Perrin J-F; Vanest,P. Physiologie cellulaire.
  - D.S.A (2005) : Rapport de la direction des services agricoles vétérinaire dans la wilaya de Décostre.A, Jean.C, Zric.D, Marc.D (2004) : brucella.  
[www.Annedecostre-free.fr](http://www.Annedecostre-free.fr)
  - Derivaux.J et Ectors.F (1986) : Reproduction chez les animaux domestiques, volume n° 02 Ellipes : P 26-27.
  - Fensterbank.R (1986) : Brucellose des bovins et des petits ruminants, rapport de synthèse
  - Fontaine.M (1997) : Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire microbiologie du lait et des produits laitiers. P 714-715.
  - Francis J-p,1999.Update on Diagnosis ,Management and prevention of Hepatitis B Virus Infection.Clinical Microbiology,Vol.12,No.2 page 351-366.
  - Ganière J.P (2001) : La brucellose – cahiers des maladies contagieuses, Ecole nationale.
  - Ganière J.P(1990) : La brucellose – cahiers des maladies contagieuses, Ecoles nationales.
  - Garnière J.P (2002) : La brucellose – cahiers des maladies contagieuses, Ecole nationale.
  - Habibi ,B,transfusion clinique.Edition OPU,1990.page 11-23.
  - Hedibi.M , et Youceffi. S (2004) : enquête sero-épidémiologique sur la brucellose caprine dans la région de Laghouat. Impact sur la santé public. Mémoire pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire.
  - Hollereau.H, Porclor.C, Nicolas.E, Brian.A (1995). Vad-mécum vétérinaire. Edition VIGOT, P 602, 1154 –1155.
  - INRA, centre de recherche de tours, France (1986), P 111-142.

- INSP (2001) : relevé épidémiologique de 1992 à 2001. Institut national de la santé, (Ministère de la santé).
- Joffin (2004) : Bactériologie (Brucella). [www .techmicrobio.net](http://www.techmicrobio.net)
- Laghouat.
- Mohamedi, maladies infectieuses et transfusion sanguine : le virus de l'immunodéficience acquise ANS, 2001.
- Nauciel, C. Bactériologie médicale. Edition Masson, 200. page 211-214.
- Joffin (2004) : Bactériologie (Brucella). [www .techmicrobio.net](http://www.techmicrobio.net)
- Sigogneau C et Dassier P, Transfusion sanguine. 1996. page 20-25
- Smaili F Abrégé d'hématologie. Edition OPU, 2005
- Waught, A; Grant, A. Anatomie et physiologie. Edition Maloine 2003. page 59-61.
- Kamoun, P, FREJAVILLE, J.P (2002), guide des examens de laboratoire, 4<sup>ème</sup> édition
  - frammarion, P : 56-57.
- Kernboum, S (1990) : Eléments de pathologie médicale, 5<sup>ème</sup> édition Simep, P : 457-462.
- Khiati (1998) : Guide des maladies infectieuses et parasitaire, édition office de publication
  - universitaire, P : 211-214, 616.
- Larpent J.P (2002) : Introduction à la nouvelle classification bactérienne, édition 2002
  - P 60-61.
- LVR Laghouat (2005) : rapport du laboratoire vétérinaire régional de Laghouat.
- Mennencier (2002) : La brucellose hépatique. [www.Hepathoweb.com](http://www.Hepathoweb.com)
- Naoui, F (2000) : La brucellose dans la wilaya de Laghouat. Situation épidémiologique.
- Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études appliquées (D.E.A) en para-médical.
- Ouared, K (1997) : Enquête épidémiologique de la brucellose dans la wilaya de Tiaret.
- Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en sciences vétérinaires.
- Perlman, P (1973) : Conférence des pathologies médicale. Edition 1973, P : 3-21, 161.
- Pilet, C, Bourdon J.L, Toma, B, Machal, N, Balbastre, C (1979) : Bactériologie médicale et

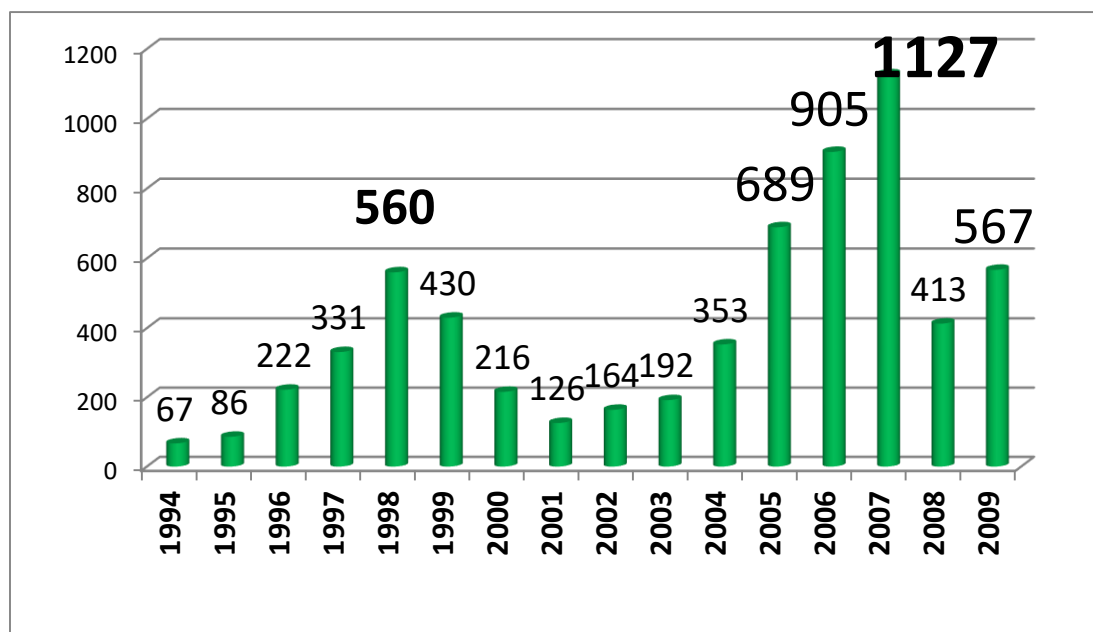
- vétérinaire « systématique bactérienne ». Edition Doin-éditeurs, P : 203-204, 208-212.
- Radot-Vallery, Pasteur.R (1963), pathologie médicale. Edition flammariion : P 873-875.
- Rahal.K, Senouci.H et Nouar-Korichi.M (1988) : Diagnostic direct et sérologique de la  
de la
- brucellose. Edition 1998, P : 17-20.
- Rossant.L (2003) : La Brucellose. [www.doctissimo.com](http://www.doctissimo.com)
- Rouibet.H, et SAIDJ.D (2003) : Diagnostic sérologique de la brucellose bovine dans la
- wilaya de Tizi-Ouzou : Mémoire pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire.
- Roux.J, Leminer.L , Veron.M (1989) : Bactériologie médicale. Edition Flammarion
- P : 654-656.
- Scheatz.F (1974) : Encyclopédie vétérinaire. Edition VIGOT frère 1974, P 210-213.
- SEMP (2005) : rapport du service d'épidémiologie et de médecine préventive (DSP Laghouat 2005).
- Stahl J.P (1995) : La brucellose. [www.santéVJF-grenoble.fr](http://www.santéVJF-grenoble.fr)
- Toma.B (2001) : La brucellose animale, Ecoles nationales vétérinaires françaises, P : 21-25.
- Vangoldsenhoven et schooenaers.F (1959) : Maladies infectieuses des animaux domestiques A. l'école vétérinaire de l'état de Cureghem (Bruxelles), P 223-224.
- [www.microbes-edu-org](http://www.microbes-edu-org)
- [www.techmicrobio-net](http://www.techmicrobio-net)
- [www.trc-ucdavis-edu](http://www.trc-ucdavis-edu)
- Brechot,C;Pol S.hépatite virale .Edition ESTEM,1993.page 13-38
- Locarnini ,S,2004.Molecular Virology of Hepatits B Virus



**Figure I:** Le taux d'incidence de la brucellose dans la Wilaya de Laghouat (1994-2010)(le service de prévention de Laghouat)



**Figure II:** La répartition des cas de brucellose par commune année 2010 dans la Wilaya de Laghouat)(le service de prévention de Laghouat)



**Figure III:** Le taux de la maladie dans la Wilaya de Laghouat (1994-2009)(service de prévention de Laghouat)

**Tableau I:** Le nombre des cas brucelliques humains déclarés dans la Wilaya de Laghouat (2005-2010) (le service de prévention de Laghouat)

Années	2005	2006	2007	2008	2009	2010 au 31/05
Wilaya Laghouat	689	923	<u>1127</u>	413	567	459

**Tableau II:** le nombre des cas bobins et caprins dépistés et brucellique dans la Wilaya de Laghouat durant la période(2000-2011)(la direction des services d'Agriculture)

Années	Bovins		Caprins	
	Nbr de têtes dépistés	Cas positifs	Nbr de têtes dépistés	Cas positifs
2000	1581	9	15072	357
2001	1171	3	10727	302
2002	1347	2	12216	294
2003	1674	7	9956	136
2004	1681	13	12251	425
2005	2698	37	34442	1230
2006	2781	32	35996	1435
2007	2172	29	6563	793
2008	2411	23	Vaccination	
2009	1576	7	Vaccination	
2010	2839	10	Vaccination	
2011	2148	10	Vaccination	

**Annexe II:****Préparation de l'antigène:**

l'antigène concentré (coffré) plus tampon vironal pour le diluer.

**Préparation du complément:**

Complément concentré plus tampon vironal (dilution selon titre).

**Préparation des hématies:**

se sont des hématies de mouton lavés par l'eau physiologique. On prend 125  $\mu$ l d'hématie pure plus 5  $\mu$ l de tampon vironal.

**Préparation des anti-hématies:**

c'est un sérum hémolytique préparé mais en le diluer toujours par le tampon vironal à raison de 5 ml de tampon plus 125  $\mu$ l hématie. Mélange l'hématie et l'anti hématie. Laisser 20 min pour la formation de complexe hématie-anti-hématie.

Après 50  $\mu$ l de cette préparation est ajoutée dans chaque cupule. La plaque est ensuite incubée à 37 °C pendant 30 min puis on fait la lecture.

**Le tampon vironal:** constitué de calcium, magnésium et eau distillé on peut aussi utiliser l'eau physiologique.