

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieure Et De La Recherche Scientifique
Université Blida 01



Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département De Biologie Et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention d'un diplôme de Master

Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire et Immunologie

Sous le thème :

Dosage du TNF- α chez les patients atteints d'une infection à *Brucella*

Présenté et soutenu le 20/09/2017 par :

BOUKERBOUB Rahima

KHENNOUR Imene Zakia

Devant le jury :

Mme EDDAIKRA Atika	MAA	Présidente
Mme AISSANI Radia	MCB	Examinatrice
Mme KECHOUT Nadia	Pr	Promotrice
Mme TALI MAAMAR Hassiba	Pr	Co-promotrice

Promotion 2017

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieure Et De La Recherche Scientifique
Université Blida 01



Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département De Biologie Et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention d'un diplôme de Master

Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire et Immunologie

Sous le thème :

Dosage du TNF α chez les patients atteints d'une infection à *Brucella*

Présenté et soutenu le 20/09/2017 par :

BOUKERBOUB Rahima

KHENNOUR Imene Zakia

Devant le jury :

Mme EDDAIKRA Atika	MAA	Présidente
Mme AISSANI Radia	MCB	Examinatrice
Mme KECHOUT Nadia	Pr	Promotrice
Mme TALI MAAMAR Hassiba	Pr	Co-promotrice

Promotion 2017

Remerciements

Au terme de ce mémoire, on tient à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à son élaboration.

Tout d'abord on remercie Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la persévérance pour mener à bien ce mémoire.

On remercie énormément notre promotrice Pr Kechout N. Maitre de conférences A à la faculté de médecine d'Alger et chef du laboratoire d'immunologie cellulaire à l'IPA de Dely Brahim pour son aide précieuse qui nous a accompagné tout au long de notre travail, pour ses valeureux conseils et sa disponibilité.

On tient à remercier tout particulièrement notre Co-promotrice Pr TaliMaamar H. Maitre de conférences A à la faculté de médecine d'Alger et chef du laboratoire de bactériologie médicale à l'IPA de Dely Brahim nous lui témoignons notre gratitude pour sa patience et son soutien qui nous a été précieux afin de mener notre travail à bon port.

Nos vifs remerciements vont à Mme Eddeikra A. Maitre assistante A au département de Biologie et Physiologie Cellulaire de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Egalement au Dr Aissani R. Maitre assistante A au département de Biologie et Physiologie Cellulaire d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce présent travail.

On remercie le directeur et les responsables de l'institut pasteur de Dely Brahim, de nous avoir bien accueillis au sein de leur établissement.

On remercie toute l'équipe du service Immunologie Cellulaire ainsi que celle du service Bactériologie de l'IPA pour leur accueil, leur respect et leur gentillesse.

On remercie énormément la résidente majeure du service d'immunologie cellulaire Dr Sedfi S. pour son aide précieuse, pour les conseils qu'elle nous a prodigués et pour sa patience, la confiance qu'elle nous a témoignée a été déterminante dans la réalisation de notre travail de recherche, ainsi que Dr Saidani K. pour les consignes qu'elle nous a donné en terme de rédaction de ce mémoire. On remercie également la biologiste du service bactériologie Mme Chemli pour son aide et sa disponibilité.

Nous tenons à remercier Mme Karaoui A. de nous avoir guidés et aidés, également le Dr Atif L. pour son accueil chaleureux et son aide précieuse dans le développement de la partie épidémiologique de notre travail.

On remercie nos familles respectives qui ont eu confiance en nous et qui ont toujours été présents, leur soutien était la raison majeure pour surmonter tous les obstacles. On les remercie énormément de s'être sacrifiés afin de financer, nos études et nos sorties.

On remercie nos chères amies Boudjellal S. et Mederreg I. pour leur soutien et leurs encouragements.

Résumé

Les cytokines sont les principales substances glycoprotéiques qui orchestrent les réponses immunitaires en tant que médiateurs entre les cellules afin d'éliminer les agents pathogènes.

L'étude présente a été réalisée sur 38 patients atteints d'une infection à *Brucella* et a pour but principal le dosage de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α afin d'évaluer son taux avant et après traitement et de le comparer avec celui de 10 individus sains, tout en essayant de trouver une relation entre le taux de TNF- α et le taux des anticorps présents dans le sérum des patients.

Les résultats ont montré que les taux de TNF- α étaient significativement élevés chez les patients atteints d'infection à *Brucella* par rapport aux témoins. Par ailleurs, on n'a trouvé aucune différence statistiquement significative entre les taux de TNF- α chez les hommes et les femmes de notre groupe de patients ni entre les taux de TNF- α et les différentes tranches d'âges. D'autre part, les taux de TNF- α corrélaient avec ceux des anticorps sériques anti-*Brucella* (IgA, IgM et IgG). Nos résultats ont montré que le TNF- α est impliqué dans la brucellose.

Nos résultats correspondent avec plusieurs travaux dans ce domaine où il a été suggéré que les taux élevés de TNF- α sont associés aux caractéristiques médiatrices pro-inflammatoires de cette cytokine.

Toutefois, une autre étude avec un nombre plus élevé de patients et de témoins doit être effectuée afin de renforcer les données de la présente étude, il est aussi bien de développer d'autres recherches en liaison avec les profils cytokiniques pour mieux comprendre l'établissement des réponses immunes et d'essayer de tirer de cela un vaccin contre la brucellose dans le but de diminuer les dégâts causés par cette dernière.

Mots clés :

TNF- α , cytokine pro-inflammatoire, Brucellose, dosage, anticorps, immunité.

Abstract

Cytokines are the main glycoprotein substances that orchestrate immune responses as mediators between cells to eliminate pathogens.

The present study has been carried out on 38 patients with *Brucella* infection and the primary goal was to evaluate the levels of the proinflammatory cytokine TNF- α in order to compare it before and after treatment, also with those of 10 healthy individuals, while trying to find a relationship between the level of TNF- α and the level of antibodies present in the serum of the patients.

The results showed that TNF- α levels were significantly elevated in patients with *Brucella* infection compared to controls. In addition, no statistically significant difference was found between TNF- α levels in males and females in our patient group, and between TNF- α levels and different age groups. On the other hand, the levels of TNF- α correlate with those of serum anti-*Brucella* antibodies (IgA, IgM and IgG). Our results showed that TNF- α is involved in brucellosis.

Our results are consistent with several studies where it has been suggested that high levels of TNF- α are associated with the pro-inflammatory mediating characteristics of this cytokine.

However, another study with a higher number of patients and controls must be performed in order to strengthen the data of this study, it is also well to develop other research in connection with cytokine profiles to better understand the establishment of the immune responses and try to get a vaccine against brucellosis in order to reduce the damage caused by brucellosis.

Key words :

TNF- α , pro-inflammatory cytokines, brucellosis, antibodies, immunity

ملخص

السيطوكينات هي المواد الرئيسية التي تنظم الاستجابات المناعية كواسطة بين الخلايا للقضاء على مسببات الأمراض. أجريت الدراسة الحالية على 38 مريضاً يعانون من الحمى المالطية، و الهدف الأساسي منها هو فحص مستوى السيبتوكين عامل نخر الورم- α من أجل تقييم معدلاتها ما قبل و بعد العلاج و مقارنتها مع 10 أفراد بصحة جيدة، و كذلك محاولة إيجاد علاقة بين مستوى عامل نخر الورم- α و مستوى الأجسام المضادة الموجودة في مصل المرضى.

أظهرت نتائج التحاليل بأن مستويات عامل نخر الورم- α كانت مرتفعة بشكل ملحوظ عند المرضى الذين يعانون من الحمى المالطية مقارنة مع الأشخاص السليمين، إضافة إلى ذلك لم يكن هناك فرق بين مستويات عامل نخر الورم- α عند الذكور و الإناث المصابين و لا بين مستويات عامل نخر الورم- α و مختلف فئات الأعمار، من ناحية أخرى فإن مستويات هذا الأخير ترتبط مع مستويات الأجسام المضادة الخاصة بالحمى المالطية.

ترتبط هذه النتائج مع العديد من الدراسات حيث تم اقتراح أن مستويات عالية من عامل نخر الورم- α ترتبط مع خصائص الوسط المؤيدة للإلتهابات.

مع ذلك، إلا أنه من الجيد إجراء دراسة أخرى مع عدد أكبر من المرضى و الأشخاص السليمين من أجل تعزيز البيانات في إطار هذه الدراسة بل من الجيد التعمق في مجال السيبتوكينات لفهم الإستجابات المناعية بشكل أفضل و محاولة الحصول على لقاح ضد الحمى المالطية من أجل الحد من الأضرار الناجمة عنها.

الكلمات المفتاح :

عامل نخر الورم- α , السيبتوكينات, فحص, الحمى المالطية, الأجسام المضادة, المناعة.

Liste des abréviations

PRR: Pattern Recognition Receptor
TLR: TollLikeReceptor
NLR: NodLikeReceptor
CLR: C-typeLectinReceptor
PAMPS: Pathogen Associated Molecular Patterns
TNF: Tumor Necrosis Factor
IL:Interleukine
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
CXCL8: CXC Chimokin Ligand 8
MCP-1: Monocyte ChimoattractantProtein
CRD :Cystein Rich Domain
TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor
Mem-TNF: Tumor Necrosis FactorMembranaire
sTNF: Tumor Necrosis Factor Soluble
TACE: TNF α Converting Enzyme
NK: Natural Killer
DD: Death Domain
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
Ig: Immunoglobuline
ARNm: Acide Ribo-Nucléique Messenger
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
PNN: Polynucléaires neutrophiles
IFN γ : Interféron Gamma
CD: Cluster de Différenciation
Th: Lymphocytes T Helper
LPS: Lipopolysaccharides
ADN: Acide Désoxyribonucléique
GMP: Guanine Mono-phosphate
PCR : Polymérase Chain Reaction
TMP-SM : TriméthoprimeSulfaméthoxazole

Table de matières

Introduction	1
Chapitre I : Rappel bibliographique	
I- Système immunitaire impliqué dans la réponse anti-infectieuse.....	2
I-2-1- Immunité innée.....	2
I-2- Immunité adaptative.....	6
I-3- Réponse immunitaire antibactérienne.....	7
II- La brucellose.....	8
II-1- Découverte et description de Brucella spp.....	8
II-2- Manifestations cliniques de la brucellose et population à risque.....	13
II-3- Physiopathologie de la brucellose.....	13
II-4- Epidémiologie de la brucellose en Algérie.....	14
II-5- Mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte contre Brucella spp.	16
III- Diagnostic.....	18
IV- Traitement.....	19
Chapitre II: Matériel et méthode	
Matériel	21
Caractéristiques démographiques des sujets malades.....	21
Caractéristiques démographiques des sujets sains.....	21
Méthodes	22
II-1- DAS ELISA.....	22
II-2-1 Principe	22
II-1-2 Produits reconstitués non fournis par le kit.....	23
II-1-3 Produits fournis par le kit.....	24
II-2 Prélèvement.....	24
II-3 Mode opératoire.....	25
II-4 Equipement, instruments, consommable.....	27
II-5 Etude statistique.....	27
Chapitre III: Résultats et discussion	

Résultats	28
I- Caractéristique épidémiologique de la population étudiée.....	28
1- Groupe des patients.....	28
2- Groupe contrôle.....	29
II- Résultat sérologique.....	30
III-Etude du taux de TNF α	30
1- Groupe des patients.....	30
2- Groupe contrôle.....	30
III-1 Répartition et comparaison du taux de TNF α chez les patients.....	31
1- Selon le sexe.....	31
2- Selon l'âge.....	33
III-2 Comparaison des taux du TNF- α entre les patients et les témoins.....	35
IV- Corrélation entre taux d'anticorps et taux de TNF- α	36
Discussion	39
Conclusion	42
Références	
Annexes	

Liste des figures et diagrammes :

Numéro	Titre	Page
Figure1	Effets biologiques du TNF et interaction avec ses récepteurs	4
Figure2	Structure des principaux antagonistes du TNF utilisés dans les traitements anti-TNF.	5
Figure 3	Répartition mensuelle moyenne des cas de la Brucellose dans huit wilayas d'Algérie	15
Figure 4	Répartition des cas selon le sexe	15
Figure 5	Nombre de cas de la brucellose selon les mois pendant la décennie 2001-2010	16
Figure 6	Nombre de cas selon le sexe pendant la décennie 2001-2010	16
Figure 7	Schéma montrant le principe de la DASELISA direct et indirect	22
Figure 8	Structure chimique du tétraméthyl-benzidine avant et après son action avec la peroxydase	23
Figure 9	Centrifugation des échantillons à 4100tr/mn pendant 10mn avec une centrifugeuse	24
Figure 10	Tube sec contenant le sang d'un patient après centrifugation	25
Figure 11	Transfert de 200µl de sérum collecté après centrifugation dans des eppendorfs	25
Figure 12	Eppendorfs contenant le sérum des patients atteints de brucellose aigue	26
Figure 13	Schéma illustrant la procédure de l'Elisa Sandwich	27
Figure 14	Répartition de la population étudiée selon le sexe.	28
Figure 15	Répartition de la population étudiée selon l'âge.	28
Figure 16	Répartition selon l'origine géographique de la population étudiée.	29
Figure 17	Résultats d'interprétations des tests sérologiques des patients	30
Figure 18	Valeurs de TNF α des patients atteints de la brucellose ainsi que le groupe contrôle	31
Figure 19	Comparaison entre les taux de TNF- α selon le sexe du groupe des patients atteints d'une brucellose	32
Figure 20	Moyennes du taux de TNF- α selon l'age	33
Figure 21	Comparaison entre les taux de TNF- α selon l'age	34
Figure 22	Comparaison entre les taux de TNF- α chez les patients atteints de brucellose et les témoins.	35
Figure 23	Corrélation entre les taux du TNF- α et les taux des IgA.	36

Figure 24	Corrélation entre les taux du TNF- α et les taux des IgG.	37
Figure 25	Corrélation entre les taux du TNF- α et les taux des IgM.	38
Diagramme 1	Les trois formes de la brucellose et leurs caractéristiques.	13
Diagramme 2	Les types de test pour diagnostiquer la brucellose.	15

Liste des tableaux :

Numéro	Titre	Page
Tableau I	Historique des expériences des découvertes du TNF	3
Tableau II	Ordres chronologique des principaux travaux sur la brucellose depuis le XIX siècle.	9
Tableau III	Types des deux colonies de la bactérie <i>Brucella</i> et les caractéristiques de chacune.	10
Tableau IV	Les différentes espèces de <i>Brucella</i> et leur répartition géographique	11
Tableau V	Les hôtes spécifiques pour chaque espèce de <i>Brucella</i> et leur degré de pathogénicité pour l'homme	12
Tableau VI	Résultats par année des sérums positifs	14
Tableau VII	Recommandation pour le traitement et la prophylaxie post-exposition à <i>Brucella</i> chez l'adulte et la femme enceinte	19
Tableau VIII	Recommandation pour le traitement et la prophylaxie post-exposition à <i>Brucella</i> chez l'enfant	20
Tableau IX	Moyennes des valeurs de TNF α chez les deux sexes du groupe des patients	32
Tableau X	Moyennes des valeurs de TNF- α chez les deux sexes du groupe des patients	31

Introduction

122ans après son apparition en Algérie, la brucellose pose toujours un problème de santé publique et fait partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire.

La fièvre de Malte est causée par un pathogène intracellulaire facultatif qui peut résider à l'intérieur des cellules phagocytaires de l'hôte, et qui est doté d'un pouvoir de résistance contre les mécanismes basiques de défenses antibactériennes (**Young et al., 1985**).

Chez le model murin, l'infection à *Brucella* stimule une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type 1 (Th1), ce qui aboutit à l'élimination de l'organisme bactérien. Le développement de ce type de réponse repose sur le contrôle des cytokines majeurs tels que : Tumor necrosis factor alpha (TNF α) (**Dornand et al., 2002**) qui d'un côté a une action antibactérienne contre *Brucella* et de l'autre agit comme un co-stimulateur dans la production d'une autre cytokine de la voie Th1, qui est l'IFN γ . (**Zhan et al., 1996**).

Plusieurs études ont rapporté que le taux d'IFN γ est significativement élevé lors d'une infection à *Brucella* (**Ahmed et al., 1999 ; Giambartolomei et al., 2002**) mais on a peu d'informations concernant celui du TNF α .

Il est connu que dans certain cas clinique, la détermination des taux de cytokines peut contribuer au pronostic, traitement et au suivie de la maladie.

Vu que les études sur les taux des cytokines inflammatoires lors d'une brucellose sont limitées, nous avons décidé de mener une étude qui a pour but principal d'évaluer le taux de la cytokine pro-inflammatoire TNF α chez les patients atteints d'une infection à *Brucella* avant et après traitement et secondaire de comparer son taux avec celui des individus sains, et d'un autre coté essayer de trouver une relation entre ce dernier et le taux anticorps sérologiques sécrété lors de la réponse contre la bactérie.

Rappel bibliographique

I- Système immunitaire impliqué dans la réponse anti-infectieuse

Nous survivons parce que nous avons acquis pendant divers années d'évolution un système de défense assez coriace pour nous permettre de lutter contre les agents pathogènes qu'on rencontre tous les jours. Bactéries soient-ils, virus, champignons ou parasites, notre système immunitaire recrute une armada de cellules capables de reconnaître le pathogène en question et l'éradiquer avant qu'il nuise à l'organisme. La réponse immunitaire est ainsi rapide et hautement spécifique.

Par convention on a divisé l'ensemble de ces mécanismes de défense en : Immunité innée et immunité adaptative.

I-2-1- Immunité innée

C'est une réponse immunitaire spontanée non spécifique, qui permet l'élimination de l'agent pathogène sans grosse dépense énergétique. Elle représente la première barrière de protection de l'hôte et est médiée par les cellules phagocytaires telles que les cellules dendritiques PNN et les macrophages qui patrouillent dans la peau et les muqueuses pour former une barrière cutanéomuqueuse.

L'immunité innée n'est pas dénuée de toute spécificité de reconnaissance puisque les cellules recrutées possèdent des PRR (Pattern Recognition Receptor) y compris les TLR, NLR, et CLR qui reconnaissent -sur la paroi de l'agent infectieux- des motifs invariants appelés PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns) (**Janot L, 2009**).

1-1- L'inflammation

Suite à un traumatisme (physique, chimique ou causé par un agent pathogène) les cellules infectées ou lésées libèrent des molécules qui servent de signaux d'alerte, certaines contribuent à la vasodilatation (Histamine, prostaglandine, bradykinine) et l'augmentation de l'apport sanguin ce qui provoque l'apparition de la rougeur et de la chaleur, d'autres augmentent la perméabilité des capillaires et entraînent une sensation douloureuse, formant ainsi des signes symptomatologiques de l'inflammation.

1-1-1- Les cytokines pro-inflammatoires

Durant l'inflammation, des cytokines et chimiokines sont produites sur le site de l'infection, et ont différents effets sur l'organisme. Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF (Tumor Necrosis Factor) et l'IL-1 (interleukine 1) augmentent localement l'activité microbicide des cellules phagocytaires. Ces mêmes cytokines participent à la coagulation (Bevilacqua *et al.*, 1986). Et activent la production de protéines vasodilatatrices comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) par les cellules endothéliales (**Bates et Harper, 2002**).

Elles stimulent également la production des chimiokines CXCL8 et MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) par les cellules épithéliales et endothéliales afin d'attirer les neutrophiles et macrophages sur le site de l'inflammation (**Giraud et al., 1998**).

De même l'activation des cellules endothéliales stimule l'expression des molécules d'adhésion à la surface des leucocytes et permet d'initier la diapédèse (**Pardi et al., 1992 ; Ley et al., 2007**). Ces cytokines peuvent avoir par ailleurs des effets systémiques sur l'organisme. En effet, il a été montré que la production de l'IL-1 β est augmenté par l'effet de d'IL-6 sur l'hypothalamus antérieur, zone du cerveau régulant la température de notre corps, provoquant ainsi la fièvre (**Klir et al., 1993**).

1-1-2- TNF α médiateur inflammatoire

La découverte du TNF est marquée par toute une série d'observations et d'expériences réalisées depuis une centaine d'années le tableau suivant les résume brièvement :

Tableau I : Historique des expériences des découvertes du TNF

Année	Travaux réalisés	Référence
1868	Bruns observe que les patients atteints de tumeurs montrent une régression de ces dernières suite à une infection bactérienne.	(Aggarwal, 2003)
1944	Shear <i>et al.</i> Ont confirmés les observations de Bruns.	(Shear <i>et al.</i> , 1943).
1975	Elizabeth Carswell montre qu'une substance présente dans le sérum des souris infectées par le Bacille de Calmette Guérin (BCG) et les LPS (Lipopolysaccharides) permet d'induire la nécrose de la tumeur et la nomme TNF.	(Carswell <i>et al.</i> , 1975)
1984	La séquence d'acides aminés du TNF humain est déterminée et la protéine est purifiée à partir d'une lignée lymphoblastoïde.	(Aggarwal <i>et al.</i> , 1984) (Pennica <i>et al.</i> , 1984) (Aggarwal <i>et al.</i> , 1985)
1985	Beutler <i>et al.</i> Travaillaient sur une molécule qui correspond au TNF, c'est la cachexine, une protéine associée aux infections parasitaires permettant l'inhibition de la protéine lipase.	(Beutler <i>et al.</i> , 1985)
1986	L'équipe de Takeda identifie le T-Différentiation-factor (une molécule qui correspond au TNF).	(Takeda <i>et al.</i> , 1986)

D'autres protéines homologues au TNF ont par la suite été découvertes et composent la superfamille du TNF. On distingue actuellement 19 molécules différentes parmi lesquelles on retrouve les lymphotoxines α et β ou encore le FAS ligand (Smith *et al.*, 1994 ; Yonehara *et al.*, 1989) . Ces 19 ligands initient leur réponse cellulaire grâce à 29 récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF (TNFR) qui se caractérisent par un domaine riche en cystéine (CRD) dans la portion extracellulaire (Locksley *et al.*, 2001).

Le TNF se retrouve dans l'organisme sous deux formes, l'une membranaire (TNF-Mb) et l'autre soluble (sTNF). Le TNF est synthétisé en premier lieu sous la forme d'une protéine transmembranaire de type II de 26 KDa. Elle est ensuite clivée par la métalloprotéinase TACE (TNF α Converting Enzyme) en une forme sécrétée de 17KDa (Black, R. A, 2002 ; Gearing *et al.*, 1994).

Le TNF α est produit par un grand nombre de cellules, immunitaires ou non, telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B, les cellules Natural killer (NK), les fibroblastes ou les neurones (Vassalli, 1992 ; Zhou *et al.*, 1995 ; Ware *et al.*, 1992). Le sTNF et le TNF-Mb interagissent via les récepteurs TNFR1 et TNFR2 (TNF Receptor 1 ou p55 ou TNF Receptor 2 ou p75) afin d'exercer leurs effets biologiques (Chan *et al.*, 2000) et peuvent tous les deux se lier à ces deux récepteurs mais il semble que la forme soluble se lie préférentiellement au TNFR1 et la forme membranaire plutôt au TNFR2 (Grell *et al.*, 1998 ; Ksontini *et al.*, 1998 ; Grell, 1995). Par ailleurs, TNFR1 et TNFR2 sont également solubles afin d'inhiber l'action du sTNF et TNF-Mb (Tracey *et al.*, 2008) (figure1).

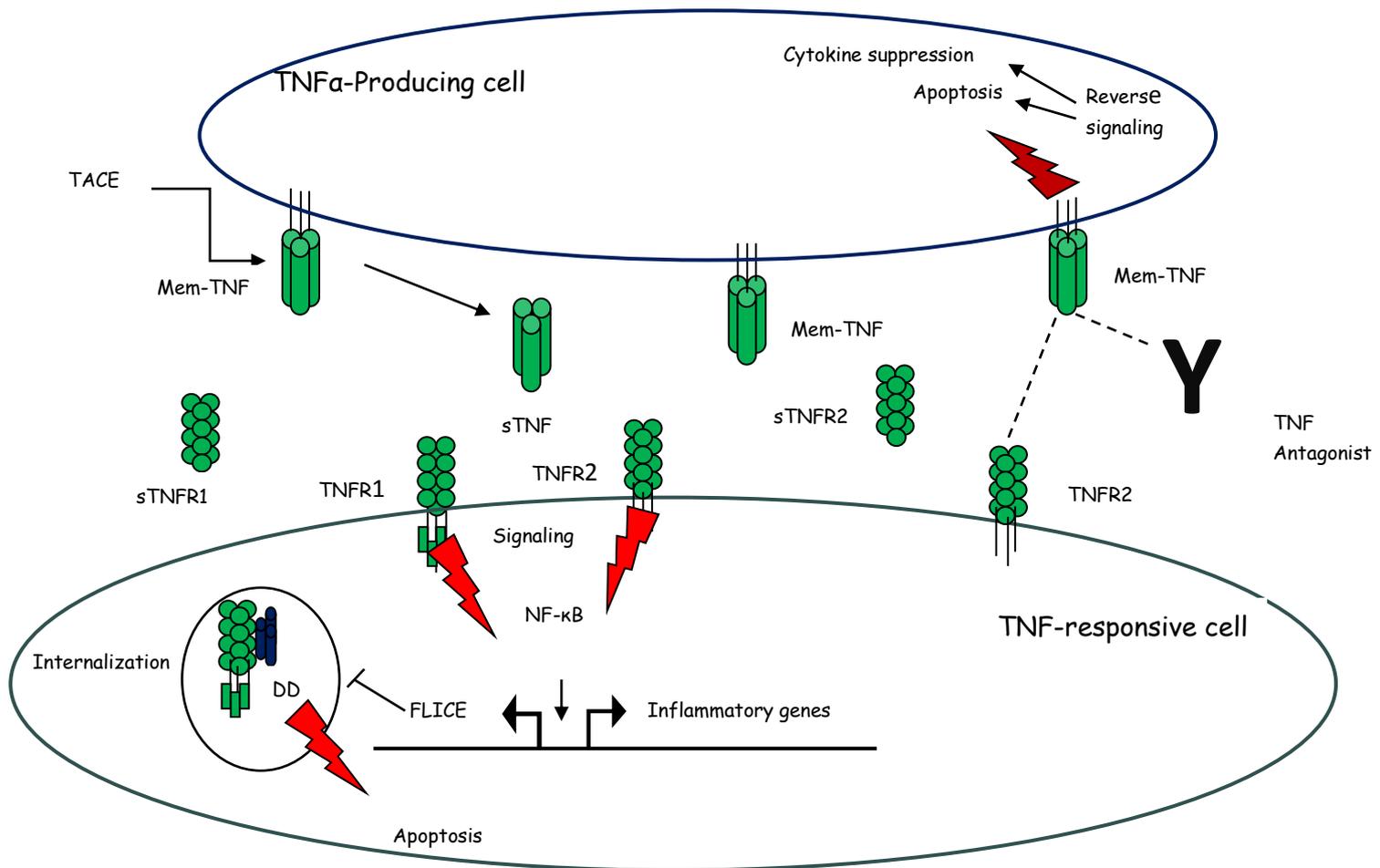


Figure 1 : Effets biologiques du TNFα et interaction avec ses récepteurs

La stimulation d'une cellule productrice de TNFα (en haut) entraîne une expression du Mb-TNF à la surface cellulaire et son clivage par les TACE afin de libérer le sTNF. Le Mb-TNF et le sTNF peuvent se lier à la surface cellulaire TNFR1 ou TNFR2 sur une cellule réceptrice de TNFα (en bas), en déclenchant des voies de signalisation qui conduisent à l'apoptose ou à l'activation de la voie NF-κB et à l'activation des gènes inflammatoires. L'induction de l'apoptose par le sTNF via TNFR1 implique l'internalisation du récepteur du ligand et l'association des domaines de mort (DD) avec les protéines adaptatrices dans la queue cytoplasmique du TNFR1 et qui est normalement bloqué par l'enzyme de conversion de l'IL-1β de type FADD (FLICE). La signalisation inverse peut être initiée par une liaison antagoniste de TNFR2 ou TNF au Mb-TNF, entraînant l'apoptose ou une suppression des cytokines. Les récepteurs de TNFα solubles (sTNFR1 et sTNFR2) peuvent être libérés à partir d'une cellule sensible au TNFα après clivage enzymatique (Tracey et al., 2008).

Les travaux de Allie *et al.* Sur des souris Knock In n'exprimant que le TNF-Mb ont permis de montrer que ces animaux résistent partiellement à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Allie *et al.*, 2008 ; Fremond *et al.*, 2005). De même ces souris ont une réponse immunitaire normale contre l'infection par *Leishmania major*, ce qui n'est pas le cas des souris TNF-/- (Allenbach *et al.*, 2008).

Le TNF joue un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire avec le bon développement et la maintenance des organes lymphoïdes (Gommerman *et al.*, 2003) (Hehlgans et Pfeffer 2005) Les souris déficientes en TNF ou TNFR1 montrent d'ailleurs une défaillance partielle dans la formation des follicules de cellules B (Pasparakis *et al.*, 1997).

Le TNF permet l'expression des chimiokines nécessaires au recrutement des leucocytes dans les tissus inflammés (Sedgwick *et al.*, 2000), et permet la formation de granulomes par les macrophages et les cellules T lors des infections par *Mycobacterium tuberculosis* ou *Brucella spp* (Flynn *et al.*, 1995 ; Rothe *et al.*, 1993).

La plupart des travaux étudient les effets du TNF sans faire de distinction entre le s-TNF et le TNF-Mb. Plusieurs équipes ont cependant montré que le TNF-Mb est impliqué lui aussi dans la cytotoxicité, l'activation des cellules B ou l'induction d'IL-10 par les monocytes (Grell *et al.*, 1998 ; Aversa *et al.*, 1993 ; Decker *et al.*, 1987), mais il peut aussi induire un retro signal grâce à un motif caséine kinase, ce qui supprime la production de cytokines ou induit l'apoptose de la cellule exprimant le TNF-Mb (Eissner *et al.*, 2000 ; Eissner *et al.*, 2004) (figure-1).

Le TNF agit normalement à faible concentration sur le site de l'inflammation mais il arrive parfois que le système ne soit pas régulé normalement. En effet, une concentration trop importante peut conduire au développement d'une pathologie plus sévère comme l'arthrite rhumatoïde où le TNF devient une cible thérapeutique importante (Brennan *et al.*, 1989) Ainsi, les souris transgéniques exprimant des quantités importantes de TNF développent spontanément une arthrite cliniquement et histologiquement similaire à l'arthrite rhumatoïde (Keffer *et al.*, 1991).

Le TNF semble donc avoir un rôle important dans la cascade d'événements conduisant au développement de l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le psoriasis. L'effet du TNF est amplifié par l'induction rapide des autres cytokines comme l'IL-1 β ou l'IL-6 (Feldmann et Maini, 2003).

Le traitement actuel de ces maladies repose sur l'administration d'anti-TNF avec l'infliximab, l'etanercept, l'adalimumab, le certolizumab pegol ; le golimumab. Tous, sauf l'etanercept qui correspond au TNFR2 fusionné à un fragment Fc d'une IgG1, sont des anticorps dirigés contre le TNF (Figure-2). Le thalidomie constitue quant à lui un autre traitement induisant la dégradation rapide de l'ARN messenger et aboutit à l'inhibition de la production de TNF (Moreira *et al.*, 1993 ; Galustian *et al.*, 2004). Tous ces traitements supprimant les effets du s-TNF et TNF-Mb sont efficaces mais ont pour effet d'augmenter les risques de maladies opportunistes comme la brucellose ou la tuberculose (Scheinfeld, 2004 ; Wallis *et al.*, 2004).

Il faut noter aussi qu'une libération excessive de cytokines peut conduire au choc septique. Le choc septique est caractérisé par une fièvre très élevée, un collapsus cardio-vasculaire, une coagulation intra-vasculaire massive et des nécroses hémorragiques aboutissant à un état de défaillance multiviscérale et fonctionnelle d'organe vitaux et à la mort.

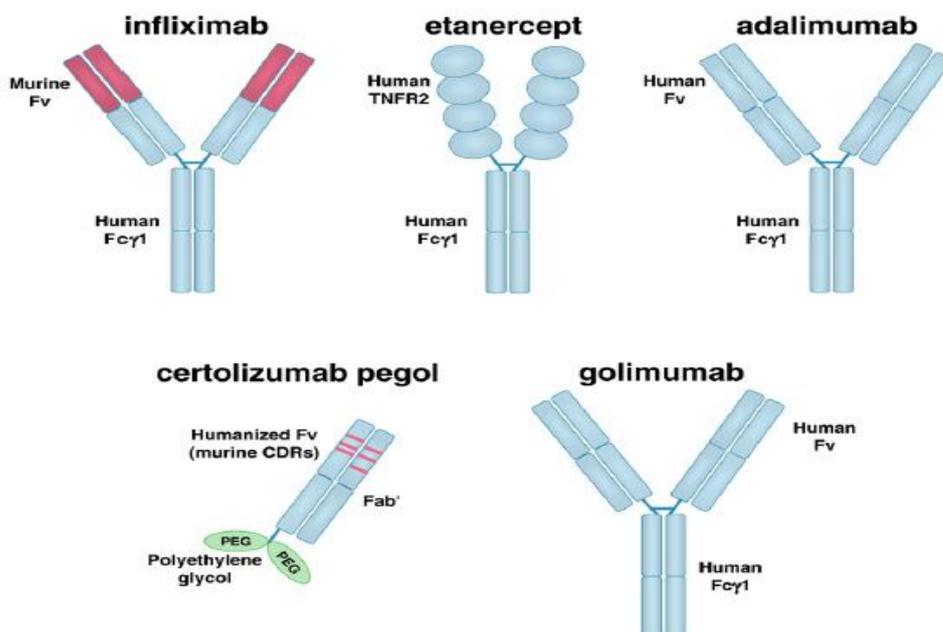


Figure2 : Structure des principaux antagonistes du TNF utilisés dans les traitements anti-TNF. Tous sont des anticorps à l'exception de l'étanercept qui est une protéine de fusion d'une portion de TNFR2 humain avec la partie Fc d'une IgG1 humaine (Tracey, 2008)

I-2- Immunité adaptative

L'immunité adaptative ou acquise est apparue il y a environ 500 millions d'années chez les premiers vertébrés. Contrairement à l'immunité innée qui reconnaît des groupes de pathogènes par le biais de molécules conservées chez tout individu et à travers plusieurs espèces, l'immunité adaptative reconnaît des structures antigéniques spécifiques par des lymphocytes B ou T dotés de récepteurs spécifiques, ce qui entraîne leur prolifération et leur différenciation. Mais cette distinction entre immunité innée et adaptative est un peu caricaturale car il existe en réalité des voies de passage entre ces deux types d'immunité. Les lymphocytes B reconnaissent les épitopes dans leur forme native et aboutissent à l'apparition d'une réaction humorale, alors que les lymphocytes T reconnaissent les épitopes sous forme de peptides et à condition qu'ils soient présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et aboutissent à l'apparition d'une réaction à médiation cellulaire (J.L.Pellerin, 2008).

Au cours de leur fabrication dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) la majeure partie des cellules de l'immunité adaptative reconnaissant des antigènes du soi sont éliminées, c'est pourquoi ce type de réponse est basé sur une distinction très fine entre le soi et le non-soi. Les organes lymphoïdes secondaires quant à eux (ganglions lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) constituent le milieu de rencontre entre les lymphocytes naïfs et l'antigène, on parle ainsi d'une réponse primaire, la réponse secondaire se produit lors d'expositions ultérieures avec le même antigène. Cette réponse est plus rapide, plus ample et plus durable, donc plus importante et plus efficace pour éliminer l'antigène. La réponse secondaire résulte de l'activation des lymphocytes mémoires. Ces cellules qui ont une longue durée de vie ont été induites lors de la réponse primaire. La mémoire permet d'optimiser la capacité du système immunitaire à combattre les infections persistantes et récurrentes.

I-3- Réponse immunitaire antibactérienne

Les bactéries se comportent dans l'organisme de l'hôte infecté comme des éléments étrangers à ses constituants, dotés de propriétés de parasitisme capables de se développer à ses dépens et produisant des effets pathologiques par leur prolifération ou par l'intermédiaire de substances qu'elles synthétisent. La pathogénicité des bactéries est un paramètre qualitatif concernant la formation de lésions et leur nature. La virulence des bactéries peut se définir être la mesure quantitative de la pathogénicité, elle est donc liée soit à la prolifération des bactéries, soit à l'intensité de libération de substances pathogènes telles que les toxines. **(A.Aarnink, 2013)**

Le passage de l'état d'infection à celui de maladie infectieuse implique un déséquilibre dans les relations entre l'hôte et les bactéries qui l'entourent au sein d'un même écosystème, parfois même couvrant ses surfaces épithéliales (flores bactériennes de la peau, du tube digestif, des voies aériennes supérieures...).

Le processus infectieux se déroule donc de diverse façon, selon les bactéries et selon les compétences immunitaires de l'hôte.

I-3-1- Réponses immunitaires contre des bactéries à multiplication extracellulaire

Les bactéries à multiplication extracellulaire peuvent échapper à la phagocytose grâce à des structures d'enveloppe de la cellule bactérienne (capsules, enveloppes protéiques), ou bien, au contraire, elles ne peuvent subsister que dans les espaces extracellulaires parce qu'elles ne résistent pas à la bactéricidie intra-cytoplasmique des cellules phagocytaires. **(J.L.Pellerin, 2008)**.

Le contact d'une cellule avec une surface bactérienne déclenche l'activation des voies alternatives et des lectines du complément qui sont des effecteurs de l'immunité innée, cette activation conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire ce qui provoque une lyse de la paroi des bactéries. De plus, les anaphylatoxines C3a et C5a augmentent la perméabilité vasculaire et stimulent la dégranulation des mastocytes et donc attire les polynucléaires neutrophiles ainsi que le C3b qui est un dérivé de la protéine C3 du complément et qui joue un rôle majeur dans la stimulation de la phagocytose tout en provoquant l'opsonisation des bactéries gram positif et négatif en se déposant à leur surface et en se liant aux récepteurs correspondant présents sur les PNN (CR1, CR3) **(Lakomy.D.2013)**

Les monocytes/macrophages interviennent dans un deuxième temps en assurant l'élimination des polynucléaires apoptotiques et des débris cellulaires ou bactériens. La réponse immunitaire humorale étant la principale réponse immunitaire adaptative protectrice contre les bactéries à multiplication extracellulaire, vient en aide à la phagocytose après sa mise en place grâce à la production de l'IFN- γ par les lymphocytes CD4 Th1, ce qui induit d'un côté l'activation des macrophages et donc la stimulation de la destruction des bactéries et de l'autre la production des anticorps par les lymphocytes B. Les anticorps vont alors neutraliser les toxines bactériennes, empêcher la liaison des bactéries aux muqueuses et épithéliums et aider les cellules phagocytaires à effectuer leur processus de phagocytose et ainsi il y'aura diminution de l'invasion bactérienne **(Lakomy.D.2013)**.

I-1-2- Réponses immunitaires contre des bactéries à multiplication intracellulaire

Les bactéries à multiplication intracellulaire telles que les mycobactéries, *Listeria*, *Salmonella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Rickettsia*...etc. sont capables de persister ou même de se répliquer dans le cytoplasme des cellules phagocytaires après avoir été phagocytées par les macrophages en inhibant les mécanismes tueurs des macrophages. Les mécanismes de défense contre ces bactéries dépendent essentiellement des lymphocytes T CD4+ de type Th1. L'IL-12 produite par les cellules présentatrices d'antigènes permet la différenciation des Th naïfs en Th1 qui sécrètent de l'IL-2, de l'IFN γ et du TNF α ce qui augmente la capacité bactéricide des macrophages. Et donc les T CD4+ sont impliqués de façon prédominante dans l'élimination des pathogènes à multiplication intracellulaire et notamment intra-macrophagique.

L'activation du système immunitaire par des bactéries à multiplication intracellulaire induit des réponses Th1 comme elle induit des réponses Th2 mais à un moindre degré ce qui diminue les manifestations inflammatoires potentiellement délétères liées aux sécrétions des Th1 et donc diminue la protection conférée par ces derniers. Les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle dans l'éradication de pathogènes à multiplication intracellulaire tels que *Brucella abortus*. (Oliveira *et al.*, 2015).

Dans le cas d'infection à bactéries intracellulaires l'immunité humorale joue aussi bien son rôle dans l'élimination de ces bactéries. Tout d'abord, à la phase initiale de l'infection les anticorps peuvent bloquer la liaison des bactéries aux cellules et donc protéger les cellules de l'infection et augmentent la phagocytose des bactéries et ainsi leur destruction, ils peuvent aussi prévenir la transmission des bactéries d'une cellule à une autre cellule adjacente non infectée. Les lymphocytes B peuvent internaliser via leurs immunoglobulines de membrane les pathogènes à multiplication intracellulaire et participer ainsi à une présentation particulièrement efficace de ces antigènes aux lymphocytes T CD4+. (Oliveira *et al.*, 2015).

II- La brucellose

La brucellose, encore appelée fièvre de Malte, fièvre ondulante méditerranéenne ou mélitococcie est une zoonose due à une bactérie de gram négatif du genre *Brucella*. Elle a pu paraître d'abord à la région méditerranéenne mais a réussi à atteindre le centre et le sud de l'Amérique, le subcontinent indien, la péninsule arabique, et le moyen orient. (Hasanjani Roushan *et al.* 2015)

La brucellose animale a un impact très lourd sur l'économie, car elle cause différentes pertes dans les élevages : avortement, mortalité, stérilité des adultes, et perte de lait et de viande. Celle de l'homme n'est pas moins grave non plus car elle pose un problème aussi bien économique que médical du fait des arrêts de travail occasionnés et des indemnités perçues comme maladie professionnelle.

Pour les animaux ainsi que pour les humains, la brucellose est une maladie à déclaration obligatoire et fait l'objet d'une surveillance nationale.

II-1- Découverte et description de *Brucella spp.*

Les premiers travaux sur la brucellose remontent au XIX^e siècle, le tableau suivant les résume par ordre chronologique :

Tableau II : Ordres chronologique des principaux travaux sur la brucellose depuis le XIX siècle.

Année	Types de travaux	Référence	
1859	Identification claire de la brucellose par les médecins militaires anglais dont AJ. Marston sur l'île de Malte.	(Benhabyles, 1999)	
1863	Première description clinique publiée par Martson sous le nom de fièvre méditerranéenne.		
1887	Sir David Bruce a isolé l'agent de la maladie et l'appela <i>Micrococcus melitensis</i> .		
1896	Bang a isolé le <i>Bacillus abortus bovis</i> au Danemark		
1897	Wright a découvert que le sérum des malades agglutinait <i>micrococcus melitensis</i> et a mis au point la réaction d'agglutination au sérodiagnostic de Wright.		
1905	Zammit a défini le rôle épidémiologique de la chèvre.		
1914	Traum a isolé <i>Bacillus abortus suis</i> responsable de l'avortement des truies aux Etats unis.		
1917	Alice Evans, bactériologiste américain, établie la relation entre <i>Micrococcus melitensis</i> et <i>Brucella abortus</i> et propose la création du genre <i>Brucella</i> (et des espèces <i>Brucella melitensis</i> et <i>Brucella abortus</i>) en l'honneur des travaux de Bruce.		
1918	Alice Evans a démontré la parenté de <i>Bacillus abortus bovis</i> et <i>Bacillus abortus suis</i> .		
1920	Meyer et Shaw les ont regroupés dans le genre <i>Brucella</i> (en hommage à Bruce).		
1922	Barnet a découvert l'intradermoréaction à la mélitine.		
1953	La première isolation de l'espèce <i>Brucella ovis</i> des moutons.		(Buddle, 1956)
1966	Carmichael reconnaît l'espèce <i>Brucella canis</i> comme un agent d'avortements chez la chienne de race Beagle.		(Carmichael et al., 1967)
1994	Un cas d'avortement chez un dauphin en captivité lié à une infection par des <i>Brucella</i> différentes des espèces précédemment caractérisées, est rapporté en Californie.	(Ross et al., 1994)	
2003	Publication d'un premier rapport sur l'infection humaine par <i>Brucella spp.</i> associé à un mammifère marin	(Sohn et al. 2003)	

En Algérie, les premières descriptions ont été faites en 1895 par Cochez, et en 1899 par Legrain.

Brucella appartient à la famille des parvobactérieae. Elle a une forme coccobacille ou bâtonnet court (0,5-0,7/µm de large sur 0,6-1,5/µm de long) aux bords droits ou légèrement convexes et aux extrémités arrondies, immobile, flagellée et à GRAM négatif, ne produisant pas de capsules, ni de spores. Elle est aérobie et possède un métabolisme respiratoire qui lui est propre.

Les bactéries se présentent individuellement, plus rarement en paires, en chaînes courtes ou en petites grappes. Sa croissance est lente mais est optimale à une température entre 20° et 40 °C, un pH neutre de 6.6 et 7.4 et une pression osmotique entre 2 et 6 atmosphères.

La culture de *Brucella* permet de distinguer deux colonies :

Tableau III : Types des deux colonies de la bactérie *Brucella* et les caractéristiques de chacune (**Benhabyles, 1999**)

Colonies	Caractéristiques
Colonies lisses (S)	<ul style="list-style-type: none"> - Obtenue par culture sur milieu solide. - Contient un antigène de surface de LPS [LPS.S] qui porte des sites antigénique A et B. - L'antigène A prédomine dans certains biotypes de <i>Brucella abortus</i>, et l'antigène M dans <i>Brucella melitensis</i>.
Colonies rugueuse (R)	<ul style="list-style-type: none"> - Obtenues par culture prolongée en milieu liquide à partir des colonies lisses. - Le typage précis ne peut être réalisé que s'il s'agit de colonies lisses : les mutants R obtenus à partir des <i>Brucella S</i> perdent le LPS.S qui est remplacé par un LPS.R. commun à toutes les espèces de <i>Brucella</i> sous forme R. - <i>Brucella ovis</i> et <i>canis</i> n'ont pas d'antigène A et M, mais ils possèdent l'antigène R.

Actuellement on utilise la lyse des phages et le métabolisme oxydatif comme méthode de base pour identifier les espèces de *Brucella*, et les méthodes conventionnelles (besoin en CO₂, la production d'H₂S, les affinités tinctoriales et les épreuves d'agglutination avec les antisérums mono spécifiques) pour la différenciation des biotypes. Sur ce on a pu identifier 10 espèces : *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella ceti*, *Brucella inopinata*, *Brucella microti* et *Brucella pinnipedialis*.

Les données de la biologie moléculaire actuelle remettent en cause le découpage du genre *Brucella* en 6 espèces distinctes, car il existe une seule espèce (*Brucella melitensis*) si on se base sur le test d'homologie d'ADN. Les autres espèces constituent un groupe d'hybridation ADN-ADN remarquablement homogène, ce sont ainsi des biovars au sein de *Brucella melitensis* (**Godfroid et al.,2005**).

Tableau IV: Les différentes espèces de *Brucella* et leur répartition géographique (Maurin, 2005)

Espèce	Biotype	Répartition géographique
<i>B.abortus</i>	1 à 6 et 9	ubiquitaire
<i>B.melitensis</i>	1 à 3	Bassin méditerranéen et moyen orient
<i>B.suis</i>	1 et 3	Amérique, Asie, Océanie
<i>B.suis</i>	2	Europe centrale et occidentale
<i>B.suis</i>	4	Amérique du nord et Russie
<i>B.suis</i>	5	Russie
<i>B.canis</i>	-	Ubiquitaire
<i>B.ovis</i>	-	Bassin méditerranéen
<i>B.neotomae</i>	-	Utah (USA)

Toutes les espèces de *Brucella* ont un réservoir exclusivement animal, il est constitué par les animaux infectés, spécialement le bétail élevé par l'homme (bovins, petits ruminants...etc.), mais elles peuvent survivre longtemps hors de l'organisme animal :

- Dans le sol humide, dans le fumier répandu dans la terre, de 70 à 80 jours.
- Dans la poussière, de 15 à 40 jours selon l'humidité ambiante, pour *Brucella melitensis*.
- Dans l'eau douce à 25°C plusieurs semaines.
- Dans la laine emmagasinée dans des entrepôts pendant 110 jours, pour *Brucella abortus*.

Concernant les substances d'origine animale (on parle ici des bovins) elle peut survivre :

- 30 jours dans les urines.
- 75 jours dans les avortons.
- 120 jours dans les déjections et plus de 200 jours dans les exsudats utérins.

Quoique l'infection soit rarement acquise à partir de l'environnement, l'importance épidémiologique des facteurs du milieu ne doit pas être sous-estimée et cette résistance des *Brucella* dans le milieu extérieur facilite leur dissémination et ainsi la contamination des autres animaux et de l'homme. Ce dernier peut être contaminé par deux voies différentes :

a) Contamination par voie cutanéomuqueuse :

C'est la principale voie de contamination, elle se fait à travers les excoriations de la peau des mains, au niveau des muqueuses buccales ou nasales, des conjonctives, ou par les mains souillées. Le risque d'infection est particulièrement élevé lorsque l'on assiste les animaux au cours de la mise bas ou de l'avortement ou en cas de décollement manuel du placenta. La contamination par inhalation est également incriminée (Phillipon A., 2004 ; C.Richard et M. Kordjian, 1992).

b) Contamination par voie digestive : 25%

- L'infection se fait au travers des muqueuses digestives supérieures notamment à travers la muqueuse bucco-pharyngée (Phillipon A., 2004 ; C.Richard et M. Kordjian, 1992) elle est due essentiellement à la consommation de :
- Le lait cru qui est le principal produit alimentaire vecteur de *Brucella*, par contre une fois bouilli ou pasteurisé il ne présente aucun danger.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

- Les fromages sous forme de pâte molle fabriquée à base de lait de chèvre ou brebis : La bactérie peut y survivre jusqu'à 3 mois.
- Les viandes congelées, consommées cru ou peu cuites.
- Les légumes frais cultivés dans un terrain enrichi par des fumiers provenant d'étables ou de bergeries infectées.

Plusieurs espèces peuvent contaminer l'homme, toutefois le degré de gravité est variable selon les espèces considérées :

Tableau V: Les hôtes spécifiques pour chaque espèce de *Brucella* et leur degré de pathogénicité pour l'homme (**Hoover et Friedlander, 1997**)

Espèces	Hôte	Niveau de pathogénicité pour l'homme
<i>Brucella melitensis</i>	Habituellement pathogène pour les moutons et les chèvres mais peut infecter les bovins et l'homme.	Haute
<i>Brucella abortus</i>	Habituellement pathogène pour les bovins où elle est la cause d'avortement; elle peut également infecter d'autres espèces dont les moutons, Les chèvres, les chameaux, les yaks, les buffles, les chevaux, les chiens et l'homme.	Intermédiaire
<i>Brucella suis</i>	Habituellement pathogène pour les porcs à l'exception du biotype 4 qui est normalement pathogène pour les rennes. Peut aussi infecter d'autres espèces dont les lièvres, les rongeurs, les chiens et l'homme.	Variable
<i>Brucella neotomae</i>	Elle apparaît chez le mulot des régions désertiques de l'Ouest des Etats-Unis d'Amérique. Les infections naturelles sont inconnues chez les autres espèces.	Aucune
<i>Brucella ovis</i>	Pathogène pour les moutons, cause d'épididymite chez les béliers et d'avortement chez les brebis. Les infections naturelles sont inconnues chez d'autres espèces.	Aucune
<i>Brucella canis</i>	Pathogène pour les chiens, causant de l'épididymo-orchite chez le mâle ainsi que l'avortement et la métrite chez la femelle. Peut être transmise à l'homme.	Intermédiaire

Du fait de la contamination possible par aérosol, *Brucella* est considérée et listée par le Center of Disease Control (CDC) comme un agent du bioterrorisme de la liste B, les agents de seconde priorité. *B. suis* fut même la première arme biologique développée par les Etats-Unis dans les années 1950-1960 avant que le programme ne soit abandonné en 1969 (Degos, 2014).

II-2-Manifestations cliniques de la brucellose et population à risque

La période d'incubation de la bactérie dure en moyenne deux semaines, elle correspond à la phase locorégionale durant laquelle les *Brucella* après pénétration dans l'organisme migrent vers les relais ganglionnaires où elles se multiplient. A partir du ganglion, il y a dissémination du germe par voie sanguine (phase septicémique) et localisation ultérieure dans le système réticuloendothélial (ganglions, rate, foie, moelle osseuse), constituant des foyers infectieux intracellulaires associés à une importante réaction inflammatoire lymphocytaire (Lisgaris, 2005).

La brucellose est caractérisée par son polymorphisme clinique souvent trompeur, les formes frustes ou inapparentes sont très fréquentes, on distingue cliniquement les formes septicémiques, focalisées et chronique :

Forme septicémique (Brucellose aigue):	Brucellose focalisée:	Brucellose chronique:
<ul style="list-style-type: none"> • Fièvre: classiquement ondulante mais pouvant revêtir d'autres aspects et surtout d'intensité variable. • Sueur surtout nocturnes ayant une odeur de paille pourrie ou aigrelette. • Douleurs fugaces, variables, de siège difficile à préciser souvent osseuses musculaires ou articulaires. 	<ul style="list-style-type: none"> • La phase septicémique peut entraîner la formation de foyers secondaires. • Les formes les plus fréquentes sont l'orchite, les localisations ostéoarticulaires. • Les formes les plus graves sont les formes neuro-méningées et l'endocardite brucellienne. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elle peut apparaître des mois ou des années après l'épisode initial et alors même que la phase aigue est passée inaperçue. • Les lésions chroniques peuvent être diverse. • L'asthénie profonde psychique, physique et sexuelle est le signe majeur, on parle alors de "patraquerie".

Diagramme I : Les trois formes de la brucellose et leurs caractéristiques (Lisgaris, 2005).

Les personnes vivantes dans les exploitations infectées sont exposées, notamment ceux en contact direct avec les animaux comme les trayeurs, berger...etc. Les vétérinaires paient aussi un lourd tribut à la maladie. Les employés d'abattoirs, de l'industrie alimentaire des viandes et de laits, les bouchers sont également exposés. C'est donc une maladie professionnelle. La contamination peut aussi se produire en manipulant la bactérie aux laboratoires, et une infection peut être attrapée suite à une transfusion de sang prélevé en période d'incubation.

II-3- Physiopathologie de la brucellose

La capacité de *Brucella* à établir une infection chronique suggère l'existence d'un facteur de virulence à effets immuno-modulateurs capable de modifier la réponse immunitaire de l'hôte (Juan M. et al., 2014).

L'infection par *Brucella abortus* est en relation directe avec la production des cytokines pro-inflammatoires, c'est pourquoi la stratégie de *Brucella* à établir une infection chronique se base sur sa capacité d'éviter la mise en place d'une réponse protectrice de type 1.

Toute fois les mécanismes de pathogénicité de *Brucella* ne sont pas encore totalement connus mais les études suggèrent qu'après passage des barrières épithéliales, les organismes sont rapidement ingérés par les cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages) (**Juan M. et al., 2014**).

Le principal facteur de virulence des espèces de *Brucella* est le lipopolysaccharide (LPS) de leur paroi cellulaire, il existe à la fois des formes « S » lisses (*B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*) et « R » rugueuses (*B.canis*). Ces dernières présentent des souches possédant des LPS rugueux ayant beaucoup moins de virulence chez l'humain. Après opsonisation et ingestion par les cellules phagocytaires, les bactéries sont capables de survivre et de se multiplier à l'intérieur des phagosomes. Ceci est rendu possible par la production de dérivés azotés, d'adénine et de guanine mono phosphate (GMP), qui inhibent la fusion du phagosome et du lysosome, l'activité oxydative ainsi que la production de facteur de nécrose tumorale correspondant au système bactéricide (**Hoover et Friedlander, 1997**).

II-4- Epidémiologie de la brucellose en Algérie

Ce sont surtout les wilayas d'élevage de caprins qui notifient les incidences les plus élevées notamment celles des Hauts plateaux et du sud.

Durant la période allant de 1984 à 1990 on a remarqué une éclosion d'une importante épidémie de brucellose à Ghardaïa avec plus de 600 cas due à *Brucella melitensis* suite à la consommation de fromage frais de chèvre. D'autre région ont été touchées ; Tlemcen et Sétif (**N.Benhabyles, 1999 ; N.Benhabyles, 1992**).

En 2000, la wilaya de Sidi Bel Abbés semble la plus touchée, le marché de bétail le plus important de toute la région s'y trouve.

En 2003: L'incidence de la brucellose est de 8,79 cas / 100.000 habitants.

En 2004: L'incidence de la brucellose est en légère hausse avec 10,99 cas pour 100.000 habitants.

En 2005 : L'incidence de la brucellose a plus que doublé durant l'année: elle varie de 10,99 en 2004 à 24,71 cas pour 100.000 habitants.

Le maximum des cas est observé entre le mois de mars et août avec des incidences qui oscillent entre 2,02 et 4,28 cas pour 100.000 habitants. Durant cette période, on totalise 81 % des cas déclarés durant l'année 2005.

Une étude sérologique entre 1994 et 2003 a montré 19.03% de sérums positifs :

Tableau VI : Résultats par année des sérums positifs (H.Senouci, K.Rahal 2004)

Année	Négatifs	Total	Positifs	% des positifs
1994	75	96	21	21.87
1995	75	87	12	13.79
1996	56	62	6	9.67
1997	114	127	13	10.23
1998	129	135	6	4.44
1999	54	56	2	3.57
2000	196	292	96	32.87
2001	210	256	46	17.96
2002	290	380	90	23.68
2003	209	248	39	15.72
Total	1408	1739	331	19.03

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

Les figures ci-dessous représentent le taux d'incendie dans ces huit wilayas :

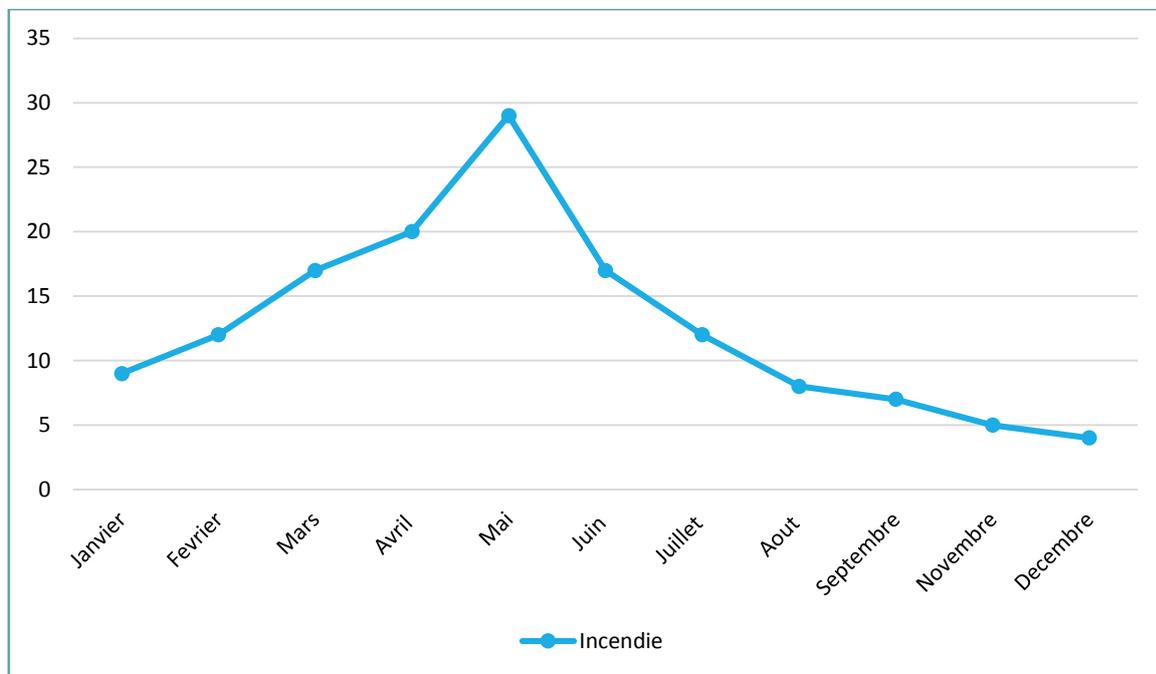


Figure 3 : Répartition mensuelle moyenne des cas de la Brucellose dans huit wilayas d'Algérie (Service épidémiologique CHU Tlemcen, 2010)

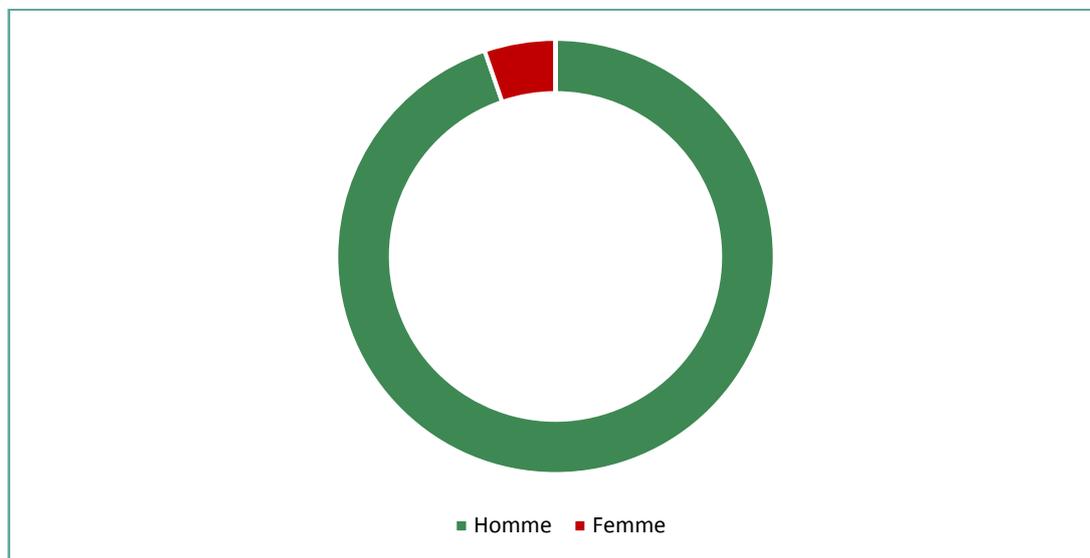


Figure 4 : Répartition des cas selon le sexe (Service épidémiologique CHU Tlemcen, 2010)

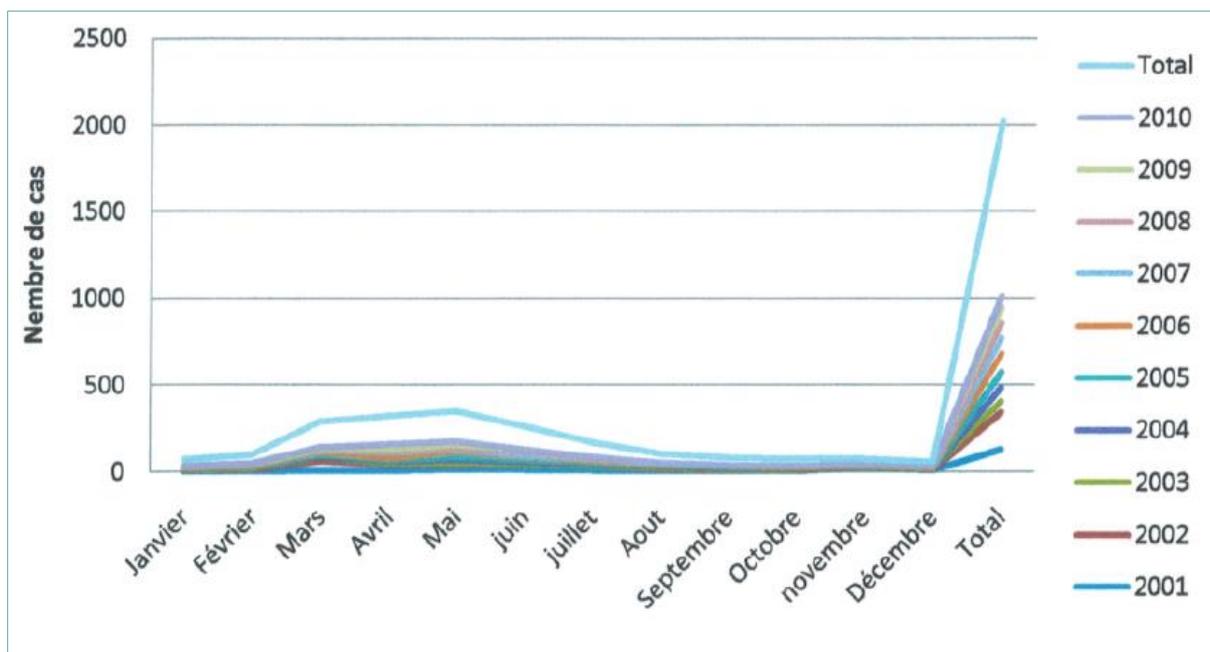


Figure 5 : Nombre de cas de la brucellose selon les mois pendant la décennie 2001-2010 (Service épidémiologique CHU Tlemcen, 2010)

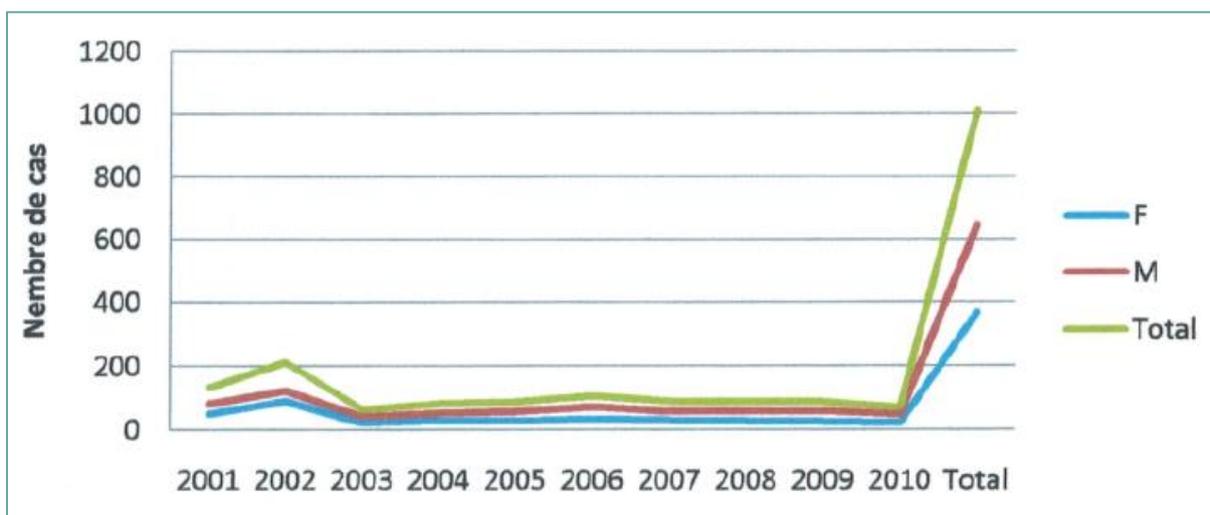


Figure 6 : Nombre de cas selon le sexe pendant la décennie 2001-2010 (Service épidémiologique CHU Tlemcen, 2010)

II-5- Mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte contre *Brucella spp.*

Les défenses spécifiques de l'hôte contre *Brucella* sont similaires à celles engagées contre les autres bactéries intracellulaires et mettent en jeu deux types de mécanisme immunitaire : une médiation humorale (mettant en jeu les anticorps) et une médiation cellulaire.

Le rôle de l'immunité à médiation humorale : l'administration passive d'anticorps directement au contact du LPS a montré une réduction du nombre de *Brucella* survivant dans le foie et la rate de souris expérimentales, indiquant le rôle des anticorps dans la protection. Cependant, le principal mécanisme de défense contre *Brucella* est basé sur la réponse la médiation cellulaire.

Le rôle de la médiation cellulaire : il a été montré qu'après avoir phagocyté *Brucella*, les macrophages présentent les antigènes de la bactérie aux lymphocytes T qui produisent alors des lymphokines. Ces agents (dont l'interféron, acteur principal dans le cas d'infection à *Brucella*) activent les anciens macrophages inefficaces et leur donnent un potentiel bactéricide. Les lymphokines dérivées des lymphocytes T attirent alors d'autres cellules sur le lieu de l'infection. Ceci conduit à la formation de granulomes.

Simultanément, d'autres cellules phagocytaires actives sont amenées sur le site de l'infection. Cette réponse inflammatoire est induite par les lymphocytes T qui produisent des cytokines, des facteurs de colonie stimulants, des facteurs de nécrose tumorale et d'interleukine. **(Alton et Forsyth, 2005)**

Suite aux réactions de l'hôte, les lésions des tissus ou granulomes provoqués par les espèces de *Brucella* chez l'homme, sont composés de cellules épithéliales, de leucocytes polymorphonucléaires, de lymphocytes et de quelques cellules géantes. En cas d'infection avec *B. melitensis* ces granulomes sont particulièrement petits, bien que la toxicité associée à cette espèce soit forte. Il n'y a généralement pas de nécroses ni de formation d'abcès, excepté dans le cas de *B. suis*. L'hypersensibilité rapidement développée par l'homme au contact des antigènes de *Brucella* suggère que la plupart des symptômes de la brucellose humaine résultent de la réaction des défenses de l'hôte. **(Alton, Forsyth, 2005)**

La sensibilité de la bactérie *Brucella* à la réponse à médiation cellulaire diffère selon les espèces considérées, *B. abortus* étant facilement éliminée contrairement à *B. melitensis* qui est rarement affectée. La lyse par le sérum (médiation humorale, activation du système du complément par les anticorps) peut se produire, même en l'absence d'anticorps d'agglutination avec, là encore, une plus grande sensibilité de *B. abortus* par rapport à *B. melitensis*. Les différences entre les types de LPS, la sensibilité à la lyse par le sérum et à la médiation cellulaire peuvent expliquer les différences de pathogénicité des espèces chez les humains.

Si elle n'est pas tuée par les mécanismes bactéricides à l'intérieur du phagosome, la bactérie détruit son hôte cellulaire et infecte d'autres cellules. *Brucella* peut aussi se répliquer extracellulairement dans les tissus de l'hôte. **(Hoover et Friedlander, 1997)**

III- Diagnostic

Le diagnostic repose sur différents types d'investigations, sérologiques et bactériologiques :

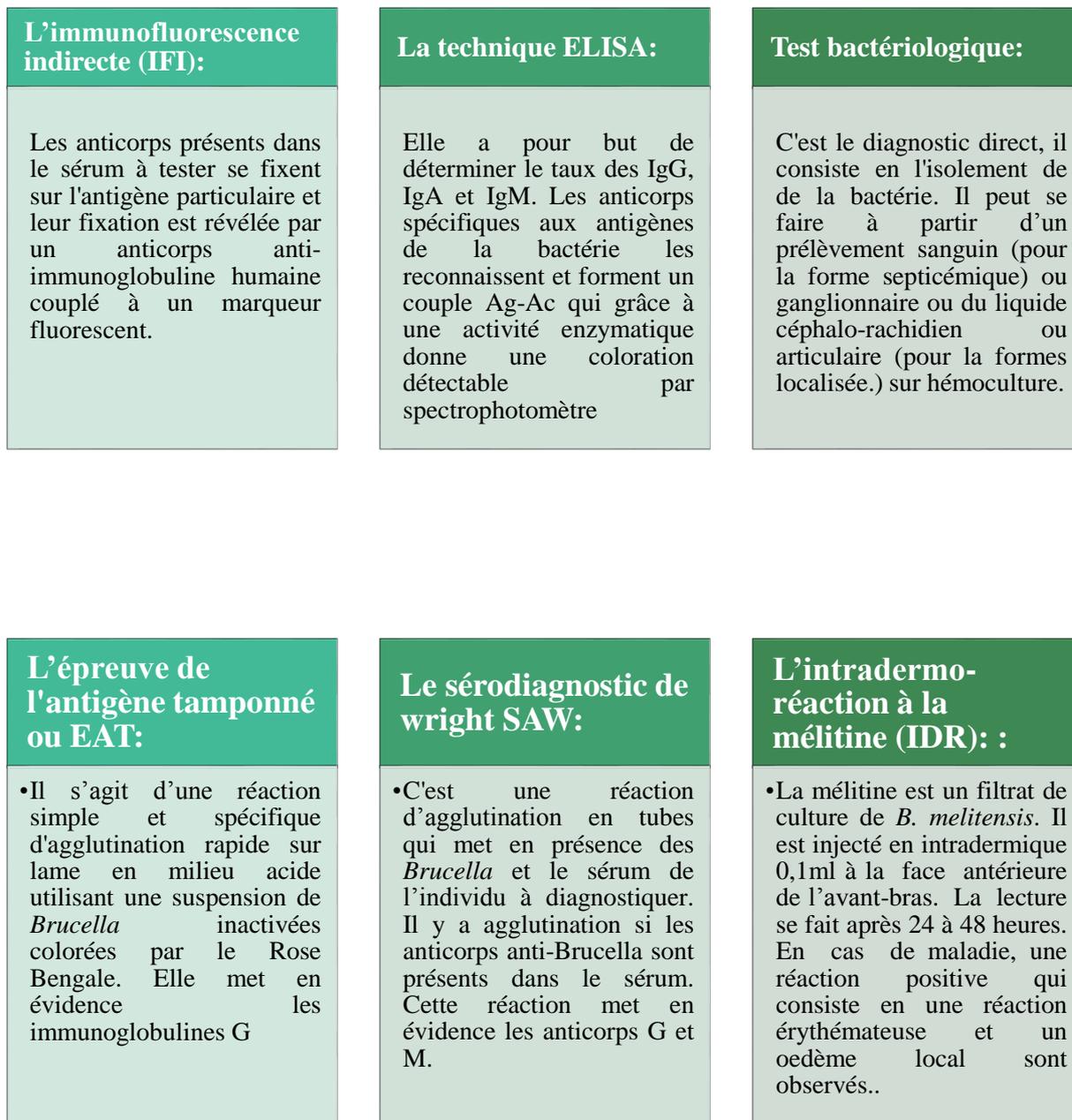


Diagramme II : Les types de test pour diagnostiquer la brucellose. (M.Gassin et A.L.Courtieu, 1978)

L'utilité des méthodes diagnostiques en fonction du stade de la maladie ainsi que la cinétique de l'évolution des anticorps sont décrits en annexe.

L'application des techniques de biologie moléculaire a permis le clonage et la caractérisation de plusieurs gènes codant pour des gènes de la membrane externe des *Brucella*. D'autre part, la technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) permet l'identification de l'ADN des *Brucella*. Il sera bientôt possible d'étendre ces travaux pour améliorer le diagnostic.

IV- Traitement

Le traitement mis en œuvre consiste à contrôler les symptômes du patient aussi vite que possible pour prévenir toute complication ou rechute (**Lisgaris, 2005**). La thérapie est basée sur l'usage d'antibiotiques, mais le choix des molécules à utiliser est encore discuté. Selon l'OMS, le traitement de référence est basé sur l'utilisation de doses de rifampicine et de doxycycline. Pour les enfants de moins de 8 ans le traitement de choix comprend l'usage de rifampicine associée à du triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SM). Toutefois, l'utilisation de streptomycine en intramusculaire et de tétracycline en prise orale semble limiter les rechutes. D'autres combinaisons sont par ailleurs envisageables. Les tableaux suivants indiquent les traitements à suivre dans les différents cas pouvant se présenter :

Tableau VII : Recommandation pour le traitement et la prophylaxie post-exposition à *Brucella* chez l'adulte et la femme enceinte (**Bossi et al., 2004**)

Adultes, Femmes enceintes		
Il est préconisé, si c'est possible, d'arrêter l'allaitement		
Traitements	Première intention	Seconde intention Première intention en cours de grossesse
Cas cliniques suspectés ou confirmés	<p>- Doxycycline: 100 mg IV x2/j avec relais par 100 mg x 2/j per os.</p> <p>et</p> <p>-Rifampicine: 10-15 mg/kg/jour en 1 ou 2 prises, avec relais par 600-900 mg per os x 1/j</p> <p>ou</p> <p>- Gentamicine: 3-5 mg/kg IV x 1/j ou 1,5-2,5 mg/kg x 2/j (max. 2 semaines)</p> <p>ou</p> <p>-Streptomycine: 1 g IM x 1 ou 2/j (max. 2 semaines)</p>	<p>-Triméthoprime (6-8mg/kg/jour)</p> <p>+ sulfaméthoxazole (40mg/kg/jour) IV en 1 ou 2 prises, relais par Triméthoprime (6-8 mg/kg/jour) + sulfaméthoxazole (40 mg/kg/jour) per os en 1 ou 2 prises</p> <p>et</p> <p>- Rifampicine: 10-15 mg/kg/jour en 1 ou 2 prises, relais par 600-900 mg per os x 1/j</p>
Prophylaxie post-exposition (3 – 6 semaines)	<p>- Doxycycline: 100 mg per os x 2/j</p> <p>et</p> <p>- Rifampicine: 600-900 mg per os x 1/j</p>	- Non recommandé

Tableau VIII : Recommandation pour le traitement et la prophylaxie post-exposition à *Brucella* chez l'enfant (Bossi *et al.*, 2004)

Enfants		
Traitements	Première intention si >8ans	Seconde intention si < 8ans
Cas cliniques suspectés ou confirmés	<p>- Doxycycline: . > 45 kg: idem adultes . < 45 kg: 2,2 mg/kg IV x2/j, relais par 2,2 mg/kg per os x2/j</p> <p>et</p> <p>- Rifampicine: 10 -15 mg/kg/jour en 1 ou 2 prises, relais par 10-15 mg/kg per os en 1 ou 2 prises par jour</p> <p>ou</p> <p>- Gentamicine: 1-2,5 mg/kg IV x 3/j (max. 2 semaines)</p> <p>ou</p> <p>- Streptomycine: 15 mg/kg IM x 1 ou 2/j (max. 2 g/j et max. 2 semaines)</p>	<p>- Triméthoprime (6-8 mg/kg/jour) + sulfaméthoxazole (30-40 mg/kg/jour) IV en 2 prises, relais par</p> <p>Triméthoprime (6-8 mg/kg/jour) + sulfaméthoxazole (30-40 mg/kg/jour) per os en 1 ou 2 prises</p> <p>et</p> <p>- Rifampicine: 10-15 mg/kg/jour en 1 ou 2 prises, relais par 10-15 mg/kg per os en 1 ou 2 prises par jour</p>
Prophylaxie post-exposition (3 – 6 semaines)	<p>- Doxycycline : . > 45 kg: idem adultes . < 45 kg: 2,2 mg/kg per os x2/j</p> <p>et</p> <p>- Rifampicine: 10-15 mg/kg per os en 1 ou 2 prises par jour</p>	<p>Triméthoprime 6-8 mg/kg/jour) + sulfaméthoxazole (30-40 mg/kg/jour) per os en 1 ou 2 prises.</p> <p>et</p> <p>- Rifampicine: 10-15 mg/kg per os en 1 ou 2 prises par jour.</p>

La stratégie de lutte actuelle est basée sur la prophylaxie sanitaire (abattage des animaux infectés) mais celle-ci rencontre des difficultés pour son application du fait d'une absence de législation réglementant les indemnités d'abattage. La vaccination préventive des animaux n'est pas introduite en Algérie bien que largement utilisée dans d'autres pays de la Méditerranée (N.Benhabyles.1999).

La prévention de la brucellose doit s'appuyer sur l'éducation sanitaire aussi bien pour les personnes exposées que pour la population générale. Une vaccination préventive des personnes exposées peut être envisagée pour certaines catégories (vétérinaire, employés des abattoirs...etc.) Celle-ci ne peut être effectuée que chez les sujets non atteints à *Brucella* (N.Benhabyles. 1999).

Matériel et méthodes

Dans le cadre du projet de fin d'étude pour obtention d'un master II, nous avons réalisé une étude de type cas témoin, traitant le dosage de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α . L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le taux de TNF α chez les patients atteints d'une infection à Brucella avant et après traitement, et secondairement comparer son taux avec celui des individus sains, et d'un autre côté essayer de trouver une relation entre ce dernier et le taux anticorps sérologiques sécrété lors de la réponse contre la bactérie.

L'étude a été faite au sein du service d'immunologie cellulaire de l'IPA Dely Brahim en collaboration avec le service de Bactériologie médicale, sur une période de 07 mois allant du janvier jusqu'au juillet 2017.

Matériel

Caractéristiques démographiques des sujets malades

La population étudiée comporte 38 patients atteints d'une brucellose, dont la tranche d'âge varie de 03 à 78 ans. Ces derniers provenaient de différentes wilayas (Alger, Sétif, Blida, M'Sila, Tipaza, Batna, Ghardaia, Adrar et Tizi Ouzou), la période de collecte s'est étalée entre décembre 2016 au juillet 2017.

Caractéristiques démographiques des sujets sains

Une deuxième population témoin comportant 10 individus dont 5 femmes et 5 hommes qui étaient en bonne santé et ne représentaient aucun signe d'infection ou de maladie était choisie comme groupe contrôle. Les 10 individus font partie du personnel du laboratoire du service d'immunologie cellulaire de l'IPA Dely Brahim

Tableau IX : Caractéristiques démographiques des patients et des sujets sains

	Patients à brucellose	Contrôle (sujet sains)
Nombre	38	10
Age (moy \pm MES)	35.4 \pm 4.80	26.8 \pm 12
Age extrêmes (ans)	[3-78]	[23-32]
Sexe ratio (H : F)	1.23	1

Le diagnostic de la brucellose a été posé par un test sérologique consistant en la détection des anticorps anti-brucella de type IgA, IgG et IgM par technique IFI ainsi que le test EAT et SAW au niveau du service de bactériologie.

Après confirmation d'atteinte de brucellose, un prélèvement de sang veineux a été effectué chez tous les sujets (patients et contrôle) sur tube sec pour dosage de la cytokine TNF α par technique immuno-enzymatique type ELISA.

Méthodes

II-1- DAS ELISA

La technique utilisée pour doser la cytokine TNF α est une technique ELISA sandwich indirect utilisant le système biotine-streptavidine, appelé DASELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay).

II-1-1- Principe

L'utilisation de la DAS ELISA nécessite de posséder 2 anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène.

La première étape consiste à fixer sur le support, l'anticorps de capture. On incube la solution pendant un temps précis selon le protocole suivi, puis on effectue un lavage. Lors de la deuxième étape, on dépose l'échantillon possédant l'antigène à identifier qu'on laisse incuber pendant x temps, puis on effectue un lavage. Dans une troisième étape, on fixe l'anticorps de détection marqué avec une enzyme sur l'antigène recherché. Pour cela, on dépose la solution d'anticorps dans les puits puis on incube l'ensemble. La dernière étape, on dépose une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme et on laisse incuber pendant quelques minutes. Le produit de réaction obtenu est soluble et coloré. L'intensité de cette coloration peut être mesurée à l'aide d'un photomètre.

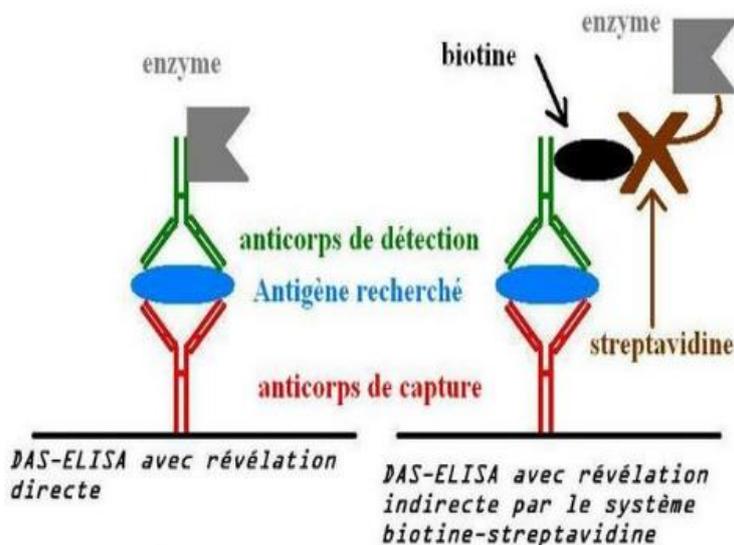


Figure 7: Schéma montrant le principe de la DASELISA direct et indirect.

La sensibilité du test DAS-ELISA direct se situe entre 1 et 10 ng/ml. Cette sensibilité peut être augmentée par l'utilisation du système indirect du fait de la forte affinité entre la streptavidine et la biotine.

La technique a été établie avec le kit Human TNF α DuoSet® ELISA (**Annexe**)

II-1-2 Produits reconstitués non fournis par le kit

- **PBS (Phosphate-buffered saline) ou (Tampon phosphate salin) :**
Utilisé pour faire la dilution d'anticorps de capture ainsi que pour la préparation de la solution de lavage et du réactif diluant.
- **Réactif diluant ou (reagent diluent) :**
Utilisé pour la saturation des sites de fixation après des anticorps de capture anti-TNF- α humain, ainsi pour la préparation des différentes dilutions telles que les anticorps de détection, la streptavidine et le standard du TNF- α humain.
- **Solution de lavage ou (wash buffer) :**
Utilisé pour le lavage des puits de la microplaque afin d'éliminer les excès de chaque réactifs après l'incubation.
- **Tween 20 :**
Utilisé dans le tampon de lavage afin d'éliminer les interactions non spécifiques des anticorps.
- **La streptavidine ou (streptavidin-HRP pour HorsRadish Peroxidase) :**
C'est une protéine conjuguée de manière covalente à une enzyme de peroxydase de raifort (HRP). La streptavidine se lie à la biotine et le HRP conjugué fournit une activité enzymatique pour la détection en utilisant un système de substrat approprié.
- **La BSA (Bovin Serum Albumin) :**
Utilisé comme constituant pour le réactif diluant et pour la saturation.
- **Le substrat tetraméthylbenzidine ou (TMB substrate solution) :**
C'est un chromogène utilisé comme révélateur de la peroxydase. Après action de la peroxydase, le TMB prend une coloration bleue dont l'absorbance peut être mesurée à 450 nm ou entre 540 et 570 nm, il est photosensible et doit être gardé à l'abri de la lumière.

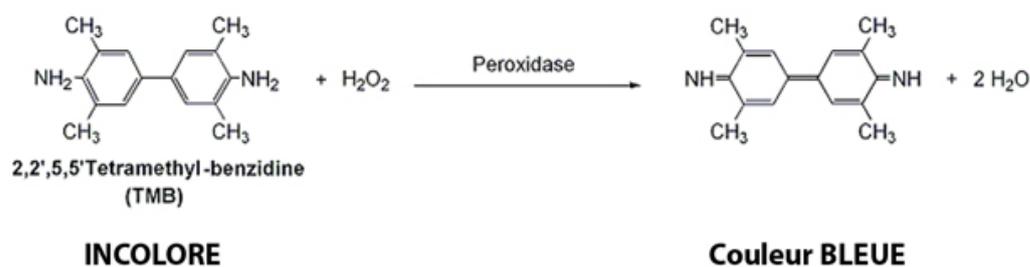


Figure 8: Structure chimique du tétraméthyl-benzidine avant et après son action avec la peroxydase (Bally et Gribnau, 1989).

- **La solution stop 2 NH₂SO₄ :**
La réaction de la peroxydase est arrêtée par l'ajout d'acide chlorhydrique 2M ou d'acide sulfurique 1M. Dans ce cas, le produit formé par le TMB sous l'action de la peroxydase prend une couleur jaune que l'on peut mesurer à 450 nm.
- **L'hypochlorite de sodium NaClO :**
Pour la désinfection des paillasses.

Les différentes préparations des solutions et des dilutions sont détaillées dans les annexes.

II-1-3 Produits fournis par le kit

- **L'anticorps de capture anti-TNF- α humain :**
Qui ont pour utilité la reconnaissance des molécules de TNF- α humain. (**Annexe 2.e**).
- **L'anticorps de détection anti-TNF- α humain :**
Qui sont des anticorps conjugués à une enzyme qui convertit le substrat et ont la capacité de se fixés sur les molécules de TNF- α humain. (**Annexe 2.f**).
- **Le standard du TNF- α humain (étalon) :**
Le kit nous fournit un flacon d'une concentration de TNF α qu'on doit diluer afin d'établir la courbe d'étalonnage pour l'extrapolation des résultats de la lecture de la D.O à la fin du test. (**Annexe 2.g ; Annexe 6.b**)

Tous les réactifs sont conservé à -20°C comme recommandé et doivent être ramené à température ambiante (20-24°C) 15min avant l'opération.

II-2 Prélèvement

Chez des patients ayant une brucellose un prélèvement de sang veineux sur tube sec à été effectué, les échantillons de sang prélevés ont été immédiatement centrifugés à 4100 tours/minute pendant 10 minutes et des quantités de sérums de 200 μ l ont été collectés et mis dans des eppendorfs puis maintenus à -80°C.



Figure 9: Centrifugation des échantillons à 4100tr/mn pendant 10mn avec une centrifugeuse

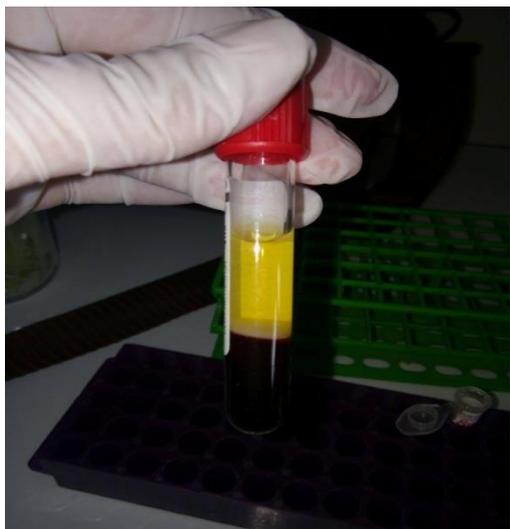


Figure 10: Tube sec contenant le sang d'un patient après centrifugation



Figure 11: Transfert de 200µl de sérum collecté après centrifugation dans des eppendorfs

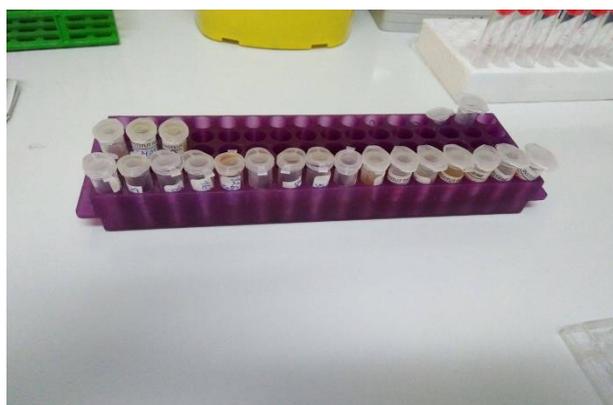


Figure 12 : Eppendorfs contenant le sérum des patients atteints d'infection à Brucella

II-3 Mode opératoire

Préparation de la microplaque

1- On fait un coating pour les puits avec 100µl de dilution d'anticorps de capture. On scelle la microplaque avec une bande adhésive et on la laisse incuber pendant une nuit à température ambiante.

Le lendemain retourner la plaque par jet sec et on s'assure que chaque puits est vide.

2- On dépose dans chaque puits 400µl de solution de lavage, et on répète l'opération 2 fois de plus pour un total de 03 lavages.

3- Les puits sont ensuite saturés par l'addition de 300µl de réactif, et on laisse incuber une heure à température ambiante.

03 lavages sont effectués mentionnés dans l'étape 2.

Procédure du dosage

1- On dépose 100µl d'échantillon ainsi que les dilutions standards. On scelle la microplaque avec une bande adhésive et on incube pendant 2h à température ambiante.

On effectue les 03 lavages.

2- On ajoute 100µl de dilution d'anticorps de détection, on couvre la microplaque avec une nouvelle bande adhésive et on laisse incuber 2h à température ambiante.

On effectue les 03 lavages.

3- On ajoute 100µl de Streptavidine-HRP préalablement diluée à chaque puits. On scelle la microplaque avec une nouvelle bande adhésive et on laisse incuber 20min à l'abri de la lumière et à température ambiante.

On effectue les 03 lavages.

4- On ajoute 100µl du substrat à chaque puits, et on incube 20min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Après l'incubation le produit donne une couleur bleu dont l'intensité est proportionnelle avec le taux des anticorps anti-TNF.

5- On ajoute 50µl de la solution stop à chaque puits. La couleur du contenu vire vers le jaune.

Immédiatement on passera à la lecture par spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 450 nm. Et on fait l'extrapolation sur la courbe établie à partir des dilutions des étalons.

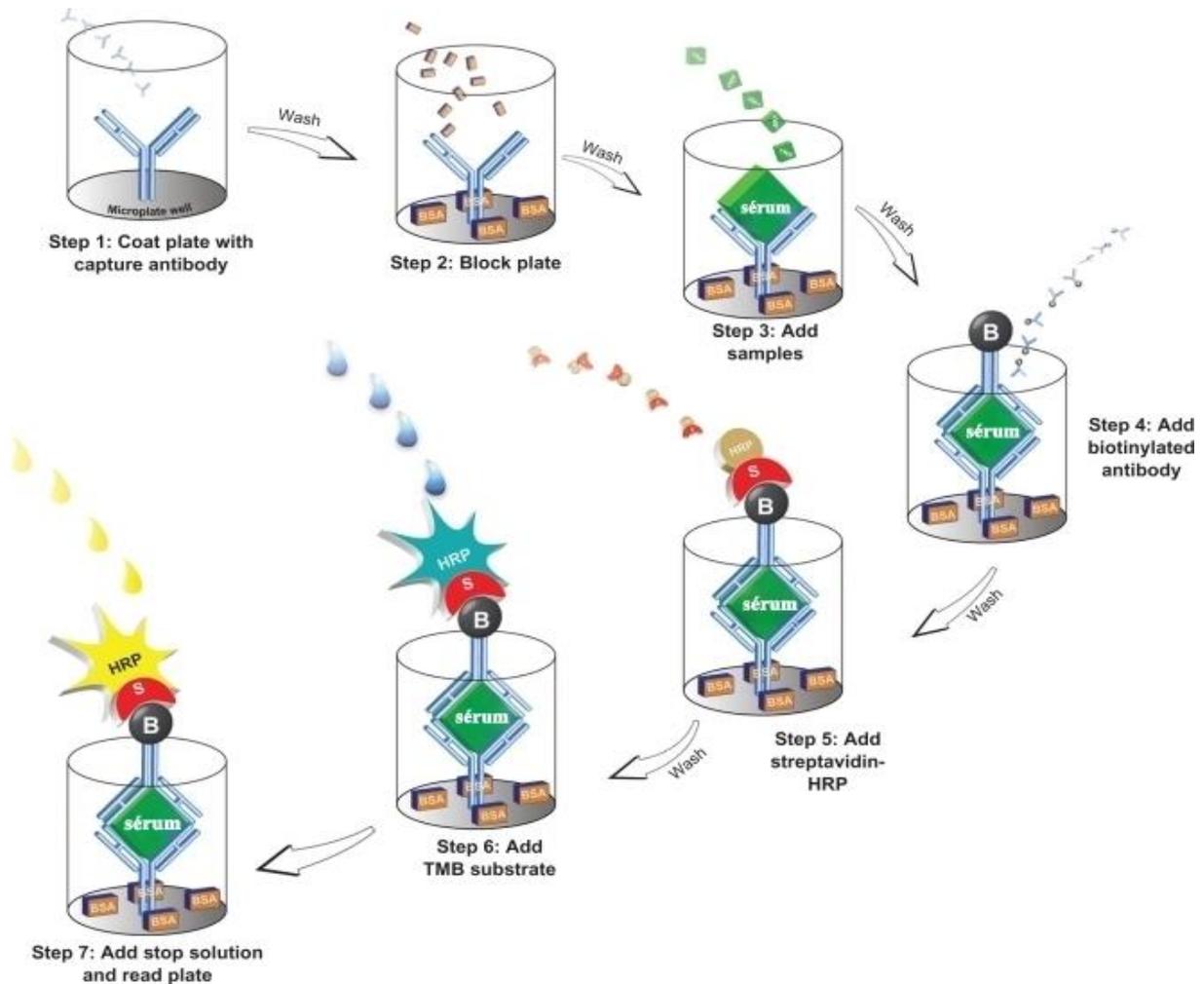


Figure 13 : Schéma illustrant la procédure de la DAS ELISA (Brendon *et al.*, 2010) (modifié)

II-4 Equipement, instruments, consommable

L'équipement, les instruments et le consommable utilisés dans la présente étude est développé dans les annexes.

II-5 Etude statistique

Les résultats sont exprimés en termes de moyennes \pm mesure d'erreur standard pour n expériences indépendantes.

Les échantillons sont comparés avec les contrôles à l'aide du logiciel Sigmaplot v11, SPSSv20 et excel par des épreuves non-paramétriques : l'épreuve de Mann-Whitney pour comparer deux échantillons entre eux (le taux de la cytokine chez les deux sexes) et l'épreuve de Kruskal-Wallis pour comparer plus de deux échantillons (comparaison du taux de TNF- α chez les différentes tranches d'âge). Enfin une corrélation de Spearman est effectuée entre le taux de TNF α et le taux des anticorps.

Résultats

Caractéristique épidémiologique de la population étudiée

a) Groupe des patients

La population étudiée est constituée de 38 patients atteints d'une brucellose, dont 17 sont des femmes et 21 des hommes avec un sexe ratio H/F de 1.23. **(Figure15)**

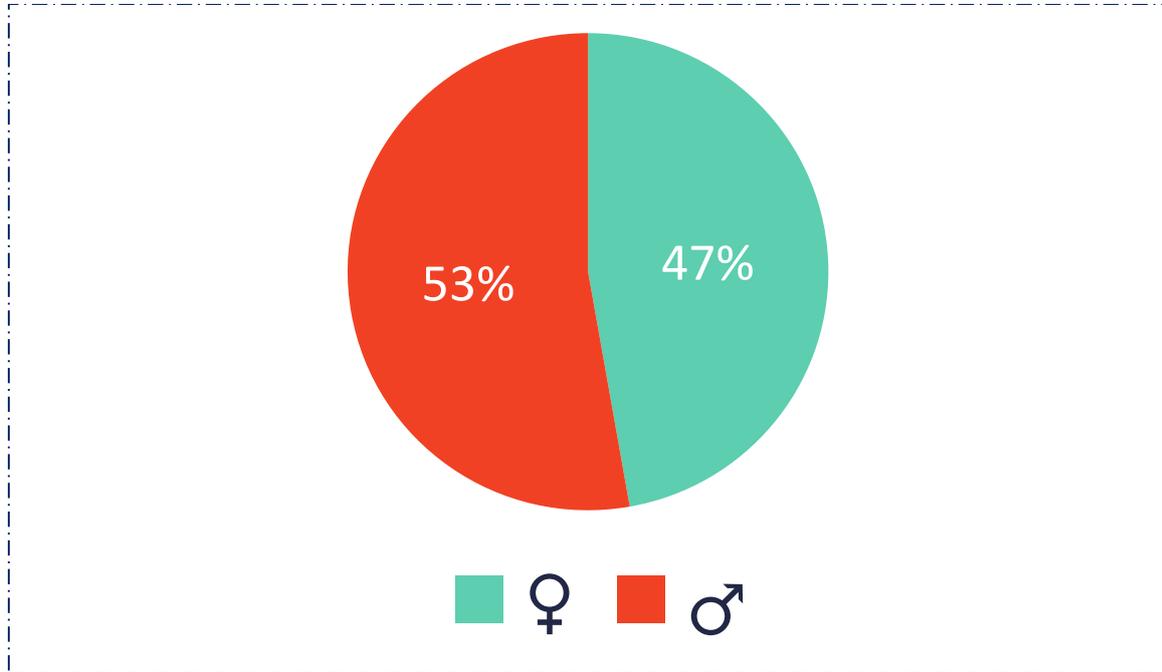


Figure15 : Répartition de la population étudiée selon le sexe

Les tranches d'âge se situent entre 03 et 78ans avec plus d'adultes que d'enfants, avec une prédominance de la tranche d'âge de [31-40] ans. **(Figure16)**

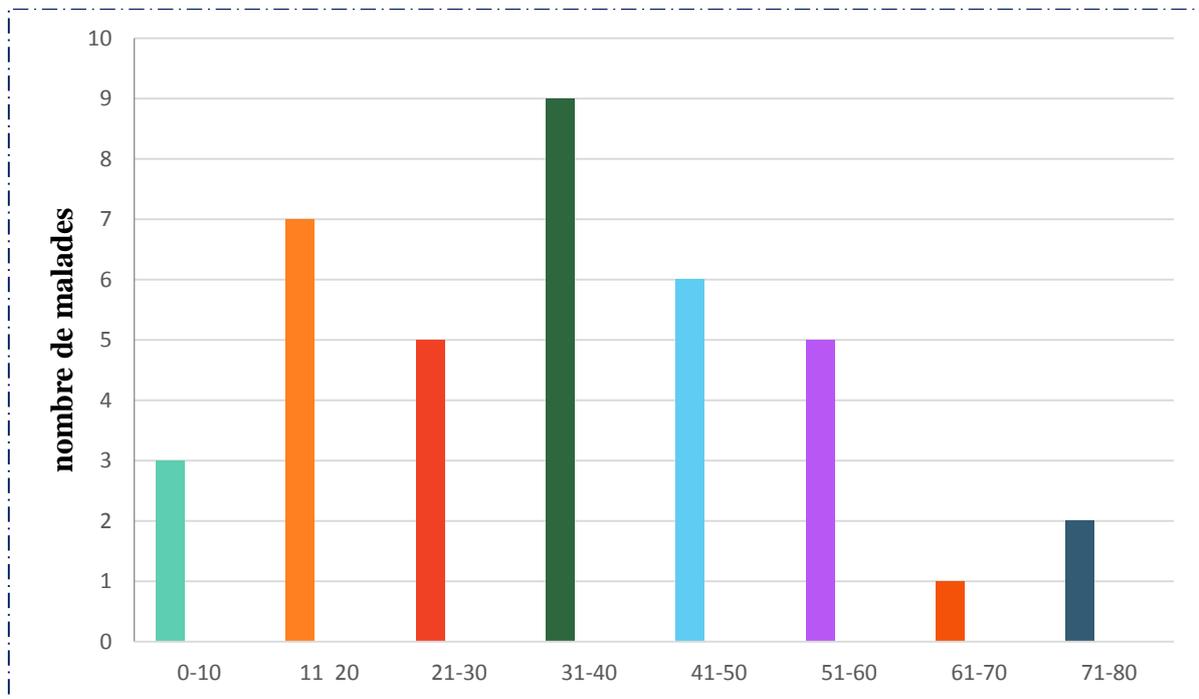


Figure 16: Répartition de la population étudiée selon l'âge

Pour la répartition géographique, les patients ont été triés selon leur wilaya d'origine. On constate une prédominance de la wilaya d'Alger (41% de patients), suivie par la wilaya de Blida (24%), Tizi-Ouzou (11%), Batna (8%) Sétif et M'sila avec (5%) et enfin Ghardaïa et Adrar (3%).

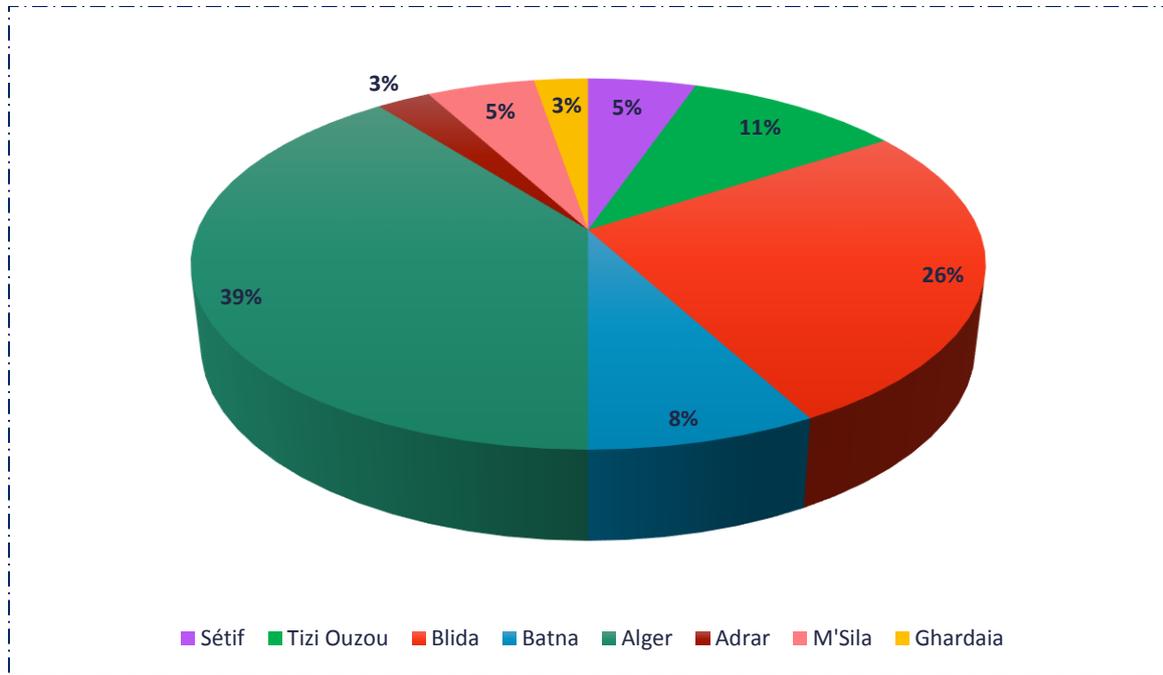


Figure 17: Répartition selon l'origine géographique de la population étudiée

b) Groupe contrôle

Les 10 personnes choisies comme témoin provenaient du personnel du laboratoire du service d'immunologie cellulaire de l'IPA. Le groupe était constitué de 5 femmes et 5 hommes âgés de 23 à 30ans.

Il faut noter que tous les témoins étaient en bonne santé et ne présentaient aucun signe d'infection ou de maladie.

II- Résultat sérologique

Les tests sérologiques (de type EAT, SAW et IFI) pour le diagnostic de la brucellose étaient effectués au niveau de l'unité de sérologie du laboratoire de bactériologie médicale. Les résultats sont illustrés dans l'**Annexe**.

L'interprétation de ces trois tests sérologiques nous a permis de classer les patients selon leur stade de maladie, en se basant sur des tableaux d'interprétation et une courbe de seuil sérologique. (**Annexe 4.a**). 92% des patients étaient en phase aiguë et les 8% restant en phase chronique.

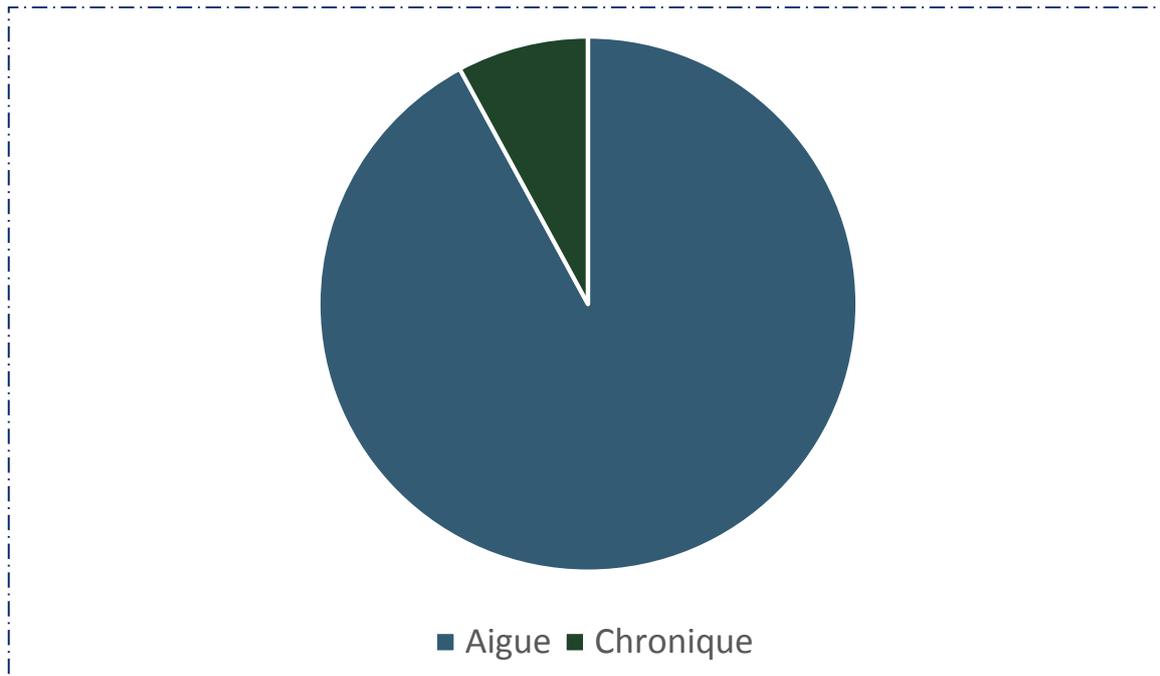


Figure 18 : Résultats d'interprétations des tests sérologiques des patients

III-Etude du taux de TNF α

Le dosage de la cytokine a été établi par la technique ELISA. Une extrapolation a été faite sur la courbe d'étalonnage établie selon la D.O des dilutions étalons. (**Annexe4.b**)

a) Groupe des patients

Les résultats du groupe des patients sont illustrés dans la **figure 19**. Tous les patients avaient des taux élevé de TNF α . (les normes étant de $6,4 \pm 0,8$ pg/ml).

a) Groupe contrôle

Tous les individus du groupe contrôle avaient des taux normaux. **Figure 19**

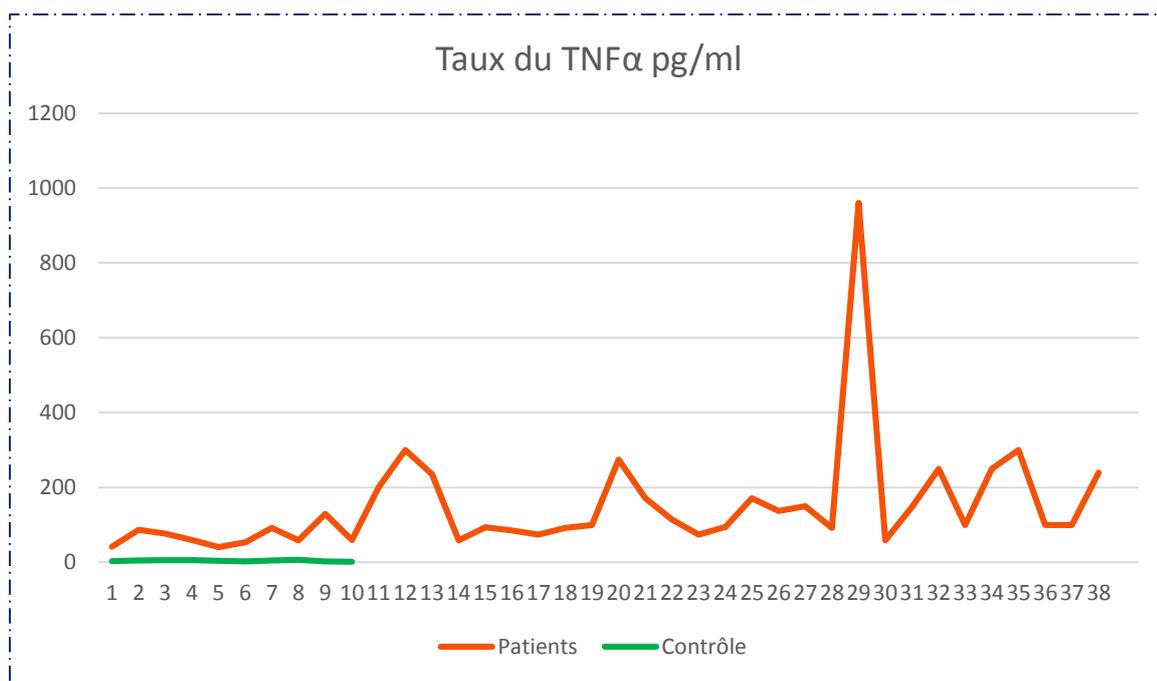


Figure 19 : Valeurs de TNF α des patients atteints de la brucellose ainsi que le groupe contrôle

III-1 Répartition et comparaison du taux de TNF α chez les patients:

a) Selon le sexe :

La comparaison du taux du TNF α selon le sexe des patients nous permis de constater qu’il n’y a pas de différence significative ($P > 0,001$)

Tableau X : Moyennes des valeurs de TNF- α chez les deux sexes du groupe des patients

	N = 38	
	M (n= 21)	F (n=17)
Age	38.61 \pm 4.17	31.82 \pm 4.72
Taux de TNFα	160.65 \pm 44.5	144.34 \pm 20.9
Taux de TNFα total	153.16 \pm 25.61	

Afin de savoir si le taux du TNF- α est en relation avec le sexe. On a effectué une comparaison entre ce dernier, chez les femmes et les hommes de notre groupe de patients atteints de brucellose.

Le résultat a montré que la différence des valeurs médianes entre les deux groupes n’est pas suffisamment élevé pour exclure la possibilité que la différence soit due à la variabilité aléatoire de l’échantillonnage, et qu’il n’y a pas de différence statistiquement significative entre les taux du TNF- α chez les deux sexes avec un ($P = 0.542$).

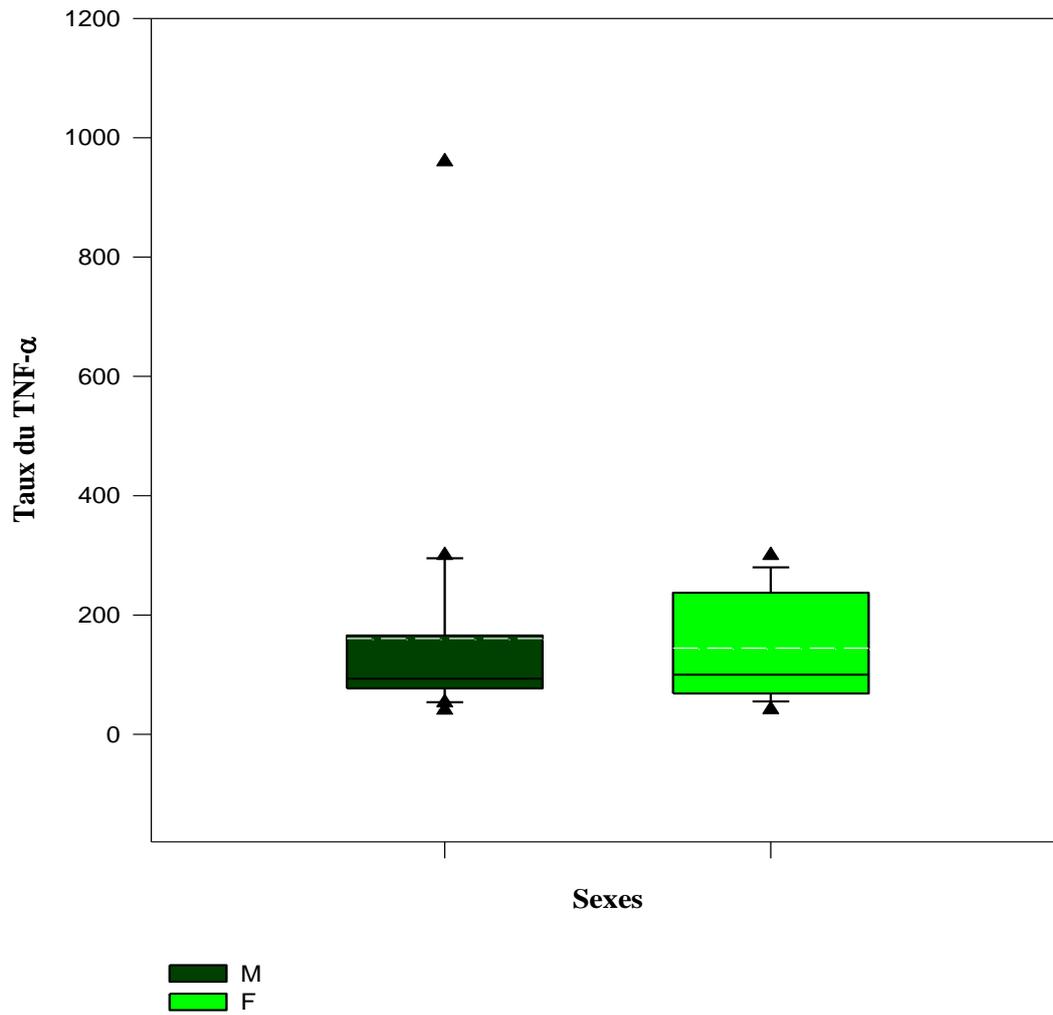


Figure 20 : Comparaison entre les taux de TNF- α chez les deux sexes du groupe des patients atteints d'une brucellose

b) Selon l'âge

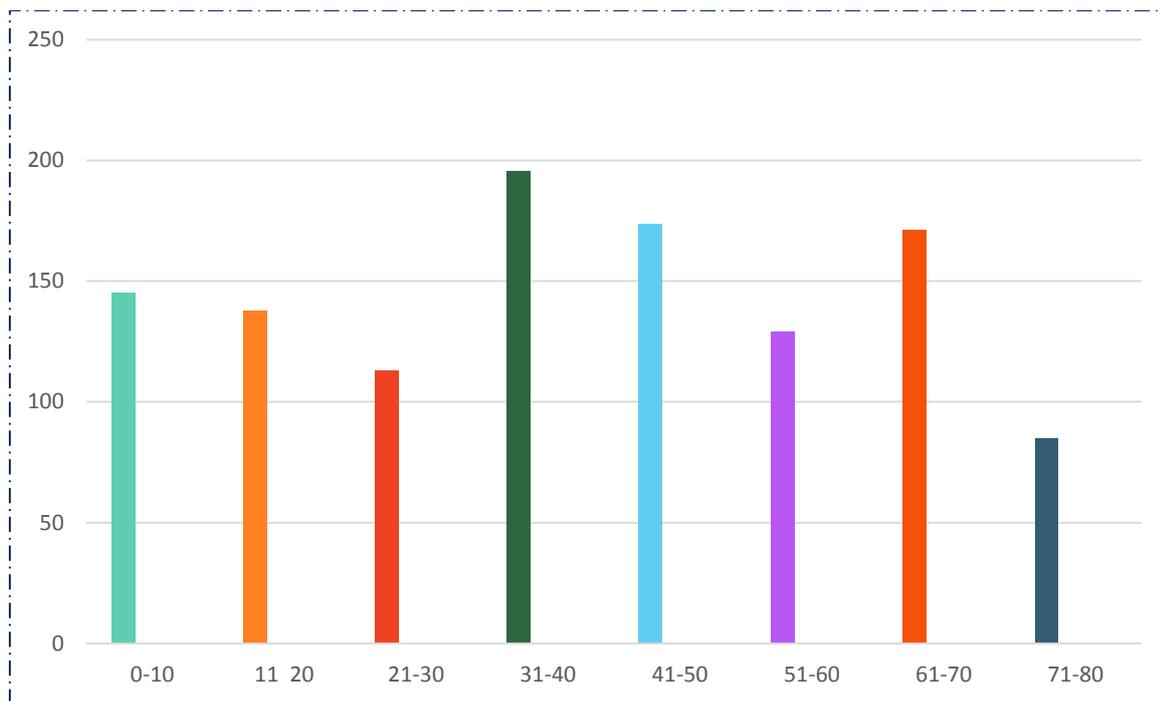


Figure 21 : Moyennes du taux de TNF- α selon l'âge

On constate des taux plus élevés chez les personnes âgées de 31 à 40ans avec une moyenne de 195.63pg/ml suivis des deux tranches d'âges [41-50] et [61-70] ans avec 173.8pg/ml et 171pg/ml respectivement. Concernant les classes restantes les taux sont les suivant : [0-10] : 145pg/ml [11-20] : 137.57pg/ml, [21-30] : 112,63pg/ml, [51-60] : 128.98pg/ml, et enfin [71-80] : 85pg/ml.

Nous avons voulu savoir si l'âge avait une influence sur le taux de TNF α . Donc on a effectué une comparaison entre ces taux et les différents groupes d'âge, le résultat a montré qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre ces derniers avec un ($P = 0.633$).

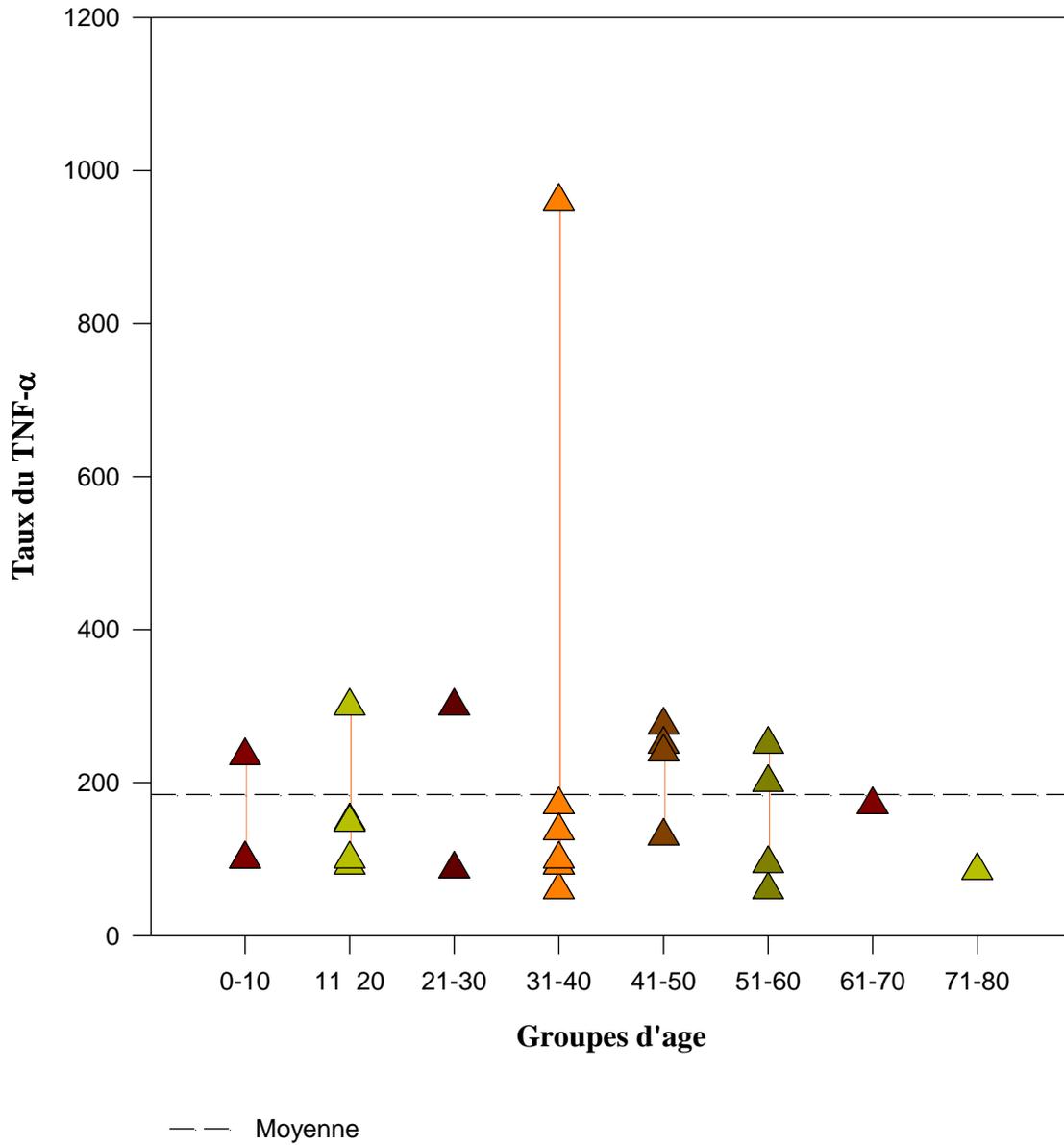


Figure 22 : Comparaison entre les taux de TNF- α des différents groupes selon l'âge

III-2 Comparaison des taux du TNF- α entre les patients et les témoins

En effectuant un test de comparaison des moyennes entre nos deux échantillons (le groupe de patients et le groupe témoin), le résultat montre qu'il existe une différence statistiquement significative avec un ($P < 0.001$) et donc le taux de TNF- α chez les patients atteints d'une brucellose est plus élevé que celui du groupe témoin.

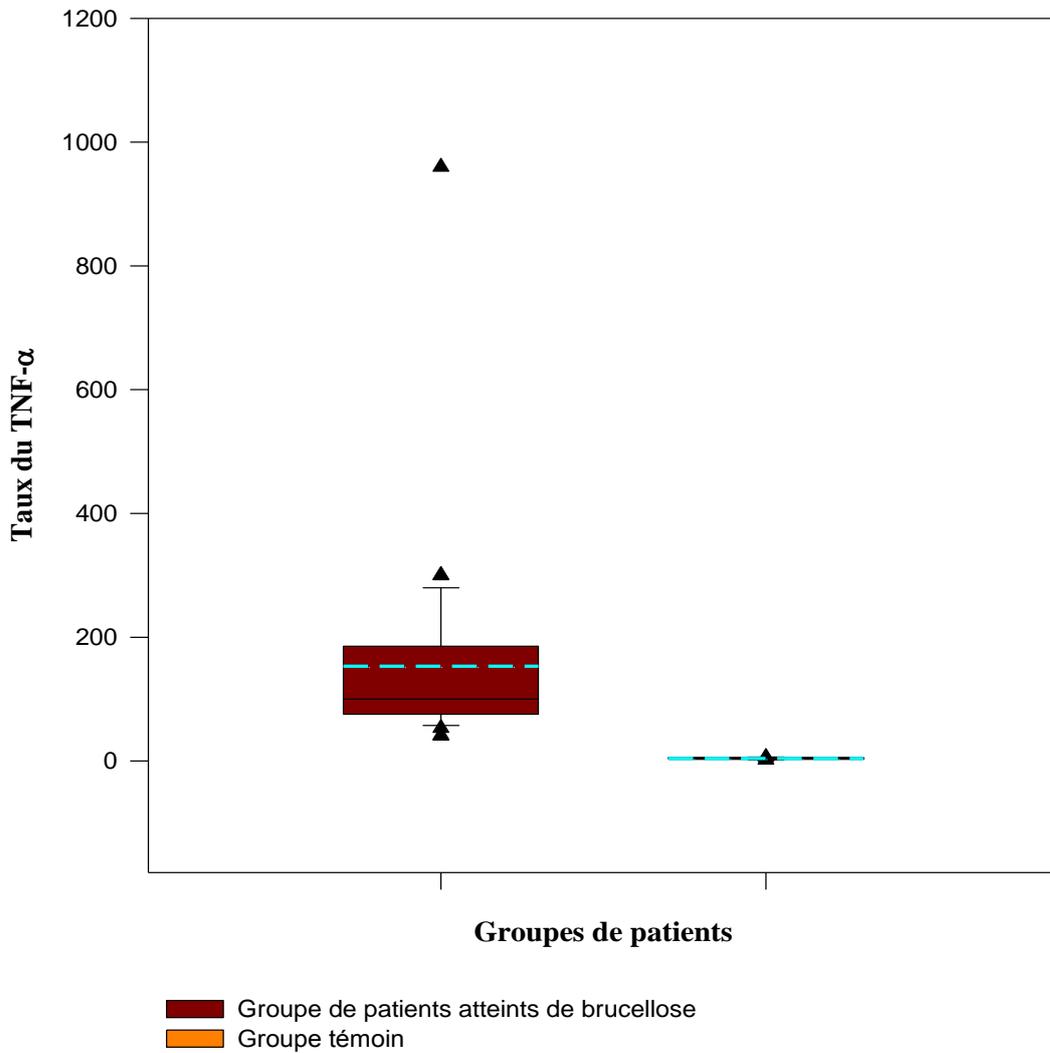


Figure 23 : Comparaison entre les taux de TNF- α chez les patients atteints de brucellose et les témoins.

IV- Corrélation entre taux d'anticorps et taux de TNF- α

Selon la courbe de seuil de sérologie (**Annexe 6.a**) le taux des anticorps change selon la phase de la maladie.

Afin de savoir si le taux de la protéine pro-inflammatoire TNF- α est aussi en relation avec l'augmentation sérique du taux des anticorps anti-*Brucella*, on a effectué un test de corrélation entre le taux de cette première (la cytokine TNF- α) et celui des anticorps IgA, IgG et IgM.

Les résultats du test de corrélation montrent qu'il y a une faible corrélation entre les taux du TNF- α et les taux des anticorps IgA, IgM et IgG.

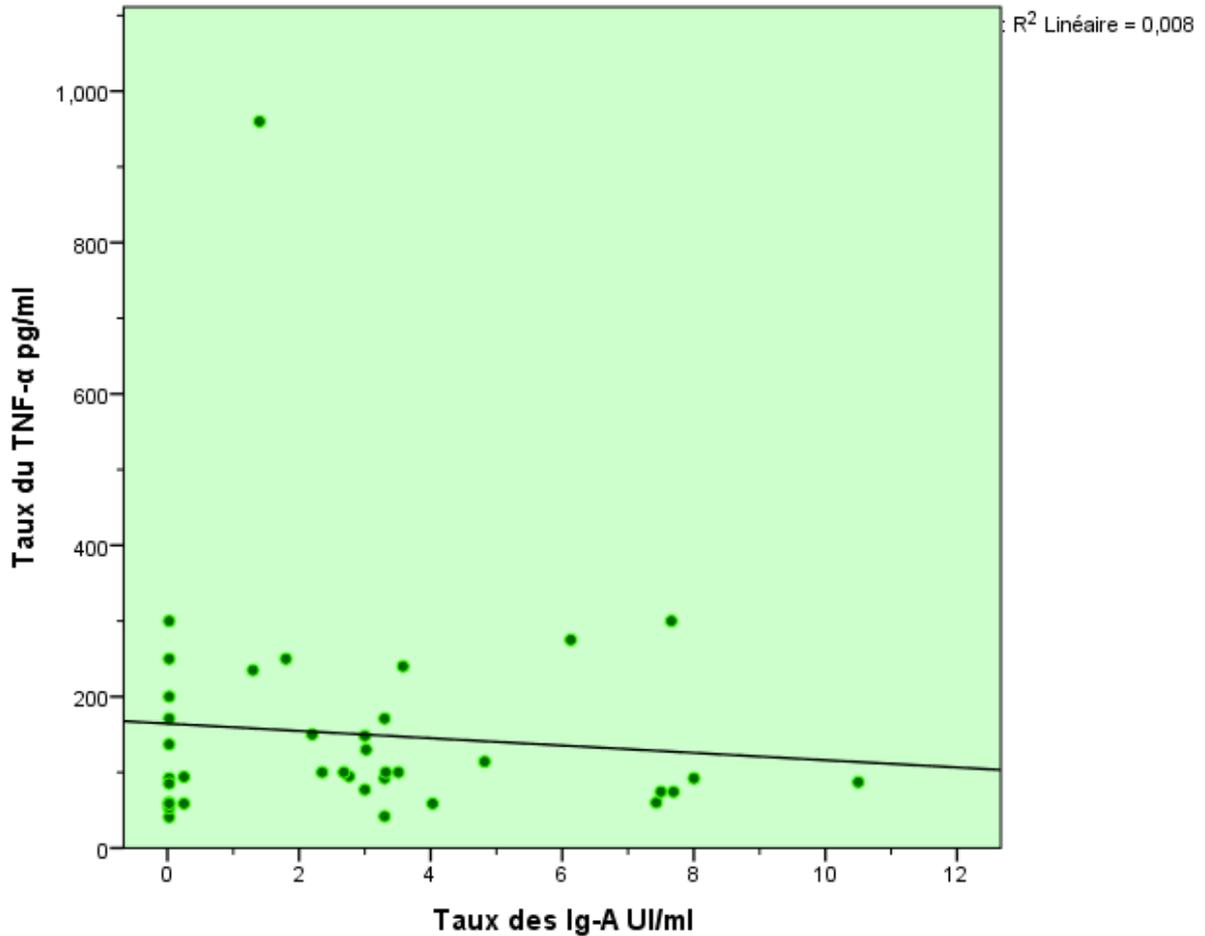


Figure 24 : Corrélation entre les taux du TNF- α et les taux des IgA.

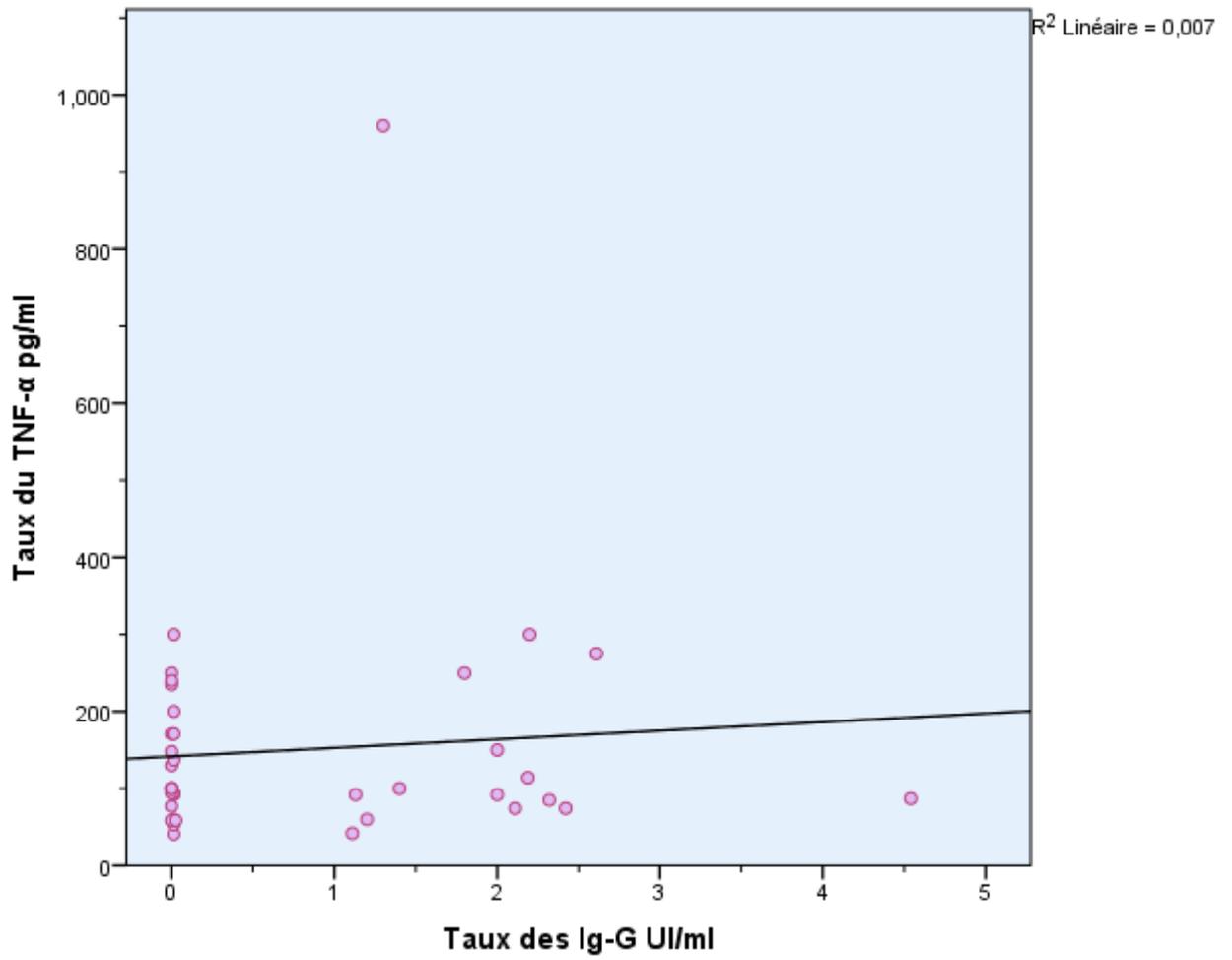


Figure 25 : Corrélation entre les taux du TNF-α et les taux des IgG.

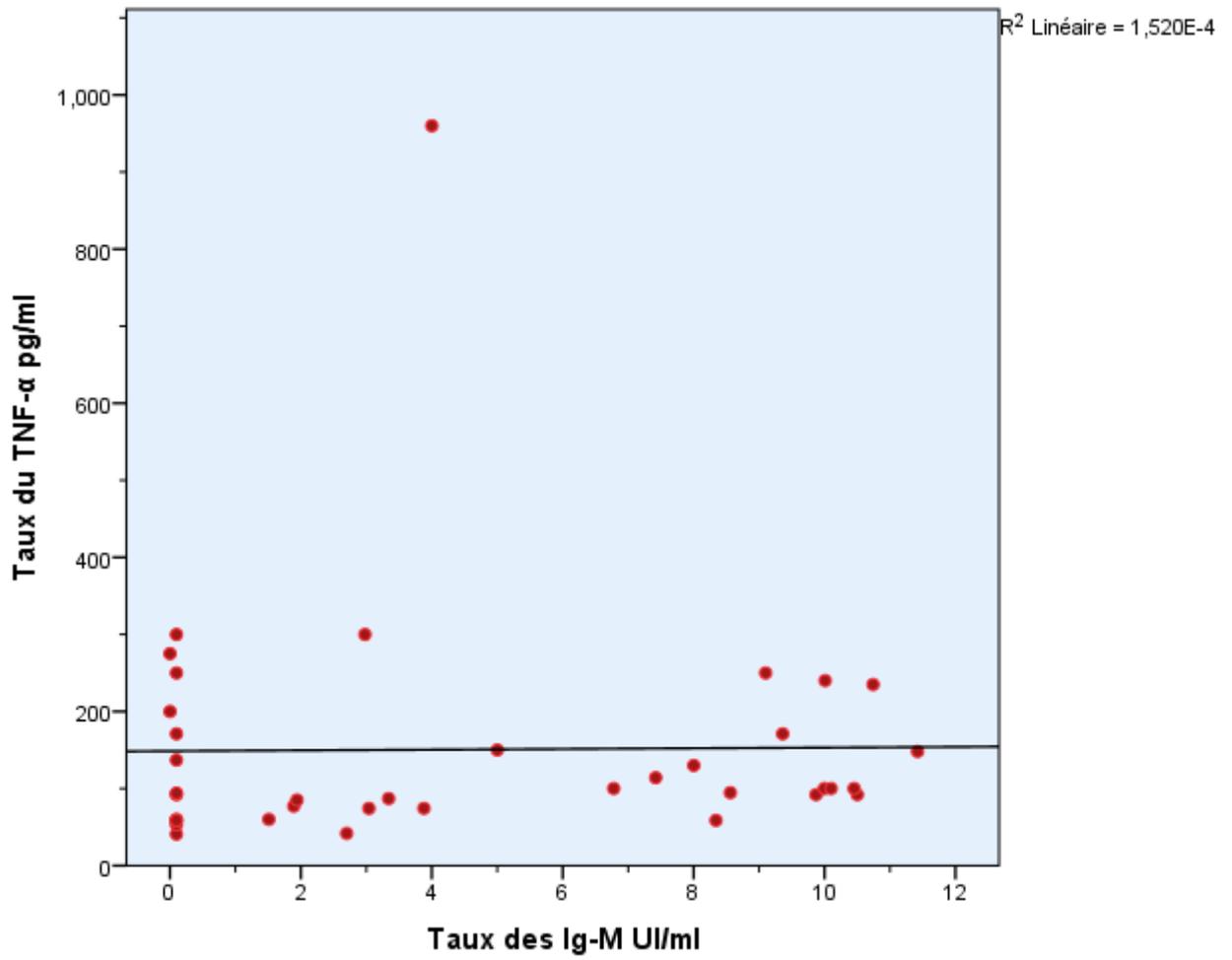


Figure 26 : Corrélation entre les taux du TNF- α et les taux des IgM.

Discussion

La réponse défensive de premier plan contre les agents pathogènes intracellulaires comme *Brucella spp.* est l'immunité cellulaire (Doğanay et Aygen, 2003 ; Pappas *et al.*, 2005). L'élimination de la brucellose est médiée par l'activation des macrophages, qui est à son tour, induit par l'immunité à médiation cellulaire Th-1. Les cytokines libérées lors de cette phase de stimulation jouent un rôle très important dans la pathogenèse de la brucellose (Odbileg *et al.*, 2008).

L'induction de la réponse Th-1 par *B. abortus* a été démontrée à la fois in vivo et in vitro (Vemulapalli *et al.*, 2000 ; Zhan et Cheers, 1998) des expériences in vitro ont démontré que *B. abortus* induit des monocytes humains et murins à sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1, où le TNF- α est un co-stimulateur dans la production de l'IFN- γ (Zhan *et al.*, 1996 ; Gorvel, J.P. et Moreno, E. 2002). Par ailleurs, il a été démontré dans une autre étude que l'appauvrissement des cellules en TNF- α n'a pas affecté la production précoce de l'IFN- γ in vivo pendant l'infection par *Listeria* (Nakane *et al.*, 1992).

De nombreuses études ont suggérées que les macrophages infectés produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , IL-6, IL-12 (Zaitseva *et al.*, 2001) , il a aussi été démontré que le TNF- α est nécessaire pour l'afflux de phagocytes sur le site d'infection (Van Furth *et al.*, 1994), pour la formation de granulome (Kindler *et al.*, 1989) et pour l'activation des macrophages (Bancroft *et al.*, 2016 ; Langermans *et al.*, 1992). La formation de granulomes localise les agents pathogènes et les expose à la phagocytose. L'injection d'immunoglobuline G anti-TNF- α a eu un effet supprimeur dramatique sur le développement de granulomes chez les patients atteints de tuberculose (Kindler *et al.*, 1989).

Il a aussi été démontré que le TNF- α est nécessaire pour l'afflux de phagocytes sur le site d'infection (Van Furth *et al.*, 1994), pour la formation de granulome (Kindler *et al.*, 1989) et pour l'activation des macrophages (Bancroft *et al.*, 1989 ; Langermans *et al.*, 1992). La formation de granulomes localise les agents pathogènes et les expose à la phagocytose. L'injection d'immunoglobuline G anti-TNF- α a eu un effet supprimeur dramatique sur le développement de granulomes chez les patients atteints de tuberculose (Kindler *et al.*, 1989).

Le TNF- α améliore fortement l'activité bactéricide des phagocytes, l'inhibition de sa production par *Brucella spp.* est utilisée comme stratégie pour la survie intracellulaire de la bactérie et l'établissement d'un parasitisme chronique (Caron *et al.*, 1994), Dans des pratiques clinique, une réactivation de la brucellose et des complications ont été signalées chez les patients atteints de rhumatologie sous traitement biologique anti-TNF- α (Papagoras *et al.*, 2009) ce qui nous permet de déduire que la présence de cette cytokine est importante pour la résistance contre l'infection à *Brucella spp.*

Les résultats de notre étude ont montré que la cytokine TNF- α est impliquée dans la brucellose aigue ainsi que chronique. Ce résultat correspond avec celui d'Akbulut *et al.* et Demirdag *et al.* qui ont suggérés que ces niveaux élevés étaient associés à des caractéristiques médiatrices pro-inflammatoires de cette cytokine et à l'augmentation des niveaux d'IFN- γ (Akbulut *et al.*, 2007 ; Demirdağ *et al.*, 2003 ; Ahmed *et al.*, 1999). Cependant, il a été rapporté que lors de l'infection par un autre pathogène intracellulaire, *M. tuberculosis*, le taux

d'IFN- γ a chuté à la suite du traitement dans l'expectoration et le sérum, alors que le TNF- α a diminué dans l'expectoration uniquement. Selon ces résultats, il a été suggéré que l'IFN- γ et le TNF- α pourraient être des marqueurs montrant une activité des maladies causées par des bactéries à multiplication intracellulaire (**Ribeiro-Rodrigues et al., 2002**).

Par ailleurs, il a été démontré dans une autre étude que le TNF- α est nécessaire pour la production d'IFN- γ par des cellules NK in vitro (**Van Furth et al., 1994**), et que l'appauvrissement des cellules en TNF- α n'a pas affecté la production précoce de l'IFN- γ in vivo pendant l'infection par *Listeria* (**Nakane et al., 1992**).

Sur le plan épidémiologique la brucellose touche les deux sexes sans exception, lors de notre comparaison on n'a pas trouvé de différence entre l'atteinte des femmes et celle des hommes. Le même résultat a été trouvé par (**A. Mailles et V. Vaillant**) lors de leur étude sur la brucellose en France.

En Iran par contre une étude menée par **M.A. Al-Musawi en 2015** a montré que les hommes étaient plus atteints que les femmes, car ils ont plus de contact avec les animaux de ferme que ces dernières et ont plus de chance à consommer de la nourriture contaminée.

De même pour l'âge, la comparaison a montré qu'il n'y a pas de différence entre l'atteinte des différentes tranches d'âge, correspondant à une étude menée en Allemagne par **Dahouk et al.**, contrairement à (**M.A Al-Musawi, 2015**) qui a trouvé que la maladie touche beaucoup plus les enfants et les adolescents : 43.1% entre 14 et 17ans, 31.1% entre 11et 13ans et 6.1% entre 5 et 7ans. En Californie **Al-Dewan et al.** ont trouvé une prédominance des personnes âgées de 55 à 64 ans et **Cekanac et al.** une prédominance des personnes âgées de 30 à 49 ans cela est expliqué par le fait que la brucellose est considérée comme une maladie professionnelle dans différents pays.

La comparaison entre les taux du TNF α a montré qu'il n'y a pas de différence entre les deux sexes ni entre les différentes tranches d'âge. **Gon et al.** ont mesuré le taux de cette cytokine chez des sujets jeunes et âgés atteints d'une pneumonie et ont trouvé que le taux de la protéine diminuait plus l'âge on avance dans l'âge (**Gon et al., 1996**) De leur côté **Peterson et al.** ont dosé le TNF α chez des sujets sains (jeunes et âgés) et n'ont trouvé aucune différence liée à l'âge dans sa production. (**Peterson et al., 1994**) Cette différence dans les résultats peut être due à l'état de santé des sujets étudiés comme à la technique de dosage utilisée.

Le dosage du TNF α après traitement n'a pas eu lieu, car il nous a été difficile de suivre les patients en cours ou après traitement cela est dû au : la longue durée du traitement et la courte durée de notre étude, les cas de brucellose augmentent en période d'été (**Shang et al., 2002**) (**Li et al., 2004**) c'est pourquoi la collecte de nos échantillons a atteint la trentaine en mois de juillet. Le traitement antibiotique selon l'OMS et les recommandations algériennes dure en moyenne 6 à 8 semaines. La deuxième cause étant la perte de contact avec les patients une fois traité, ceux-ci n'ont pas les moyens de revenir pour un contrôle après guérison.

En 2003 **Demirdag et al.** ont suivi un groupe de patients atteints de la brucellose aiguë et ont dosé différentes cytokines avant et après traitement afin de savoir la relation de ces dernières avec les marqueurs immunitaires de l'inflammation. Leurs résultats ont montré que le TNF α ainsi que l'IFN γ diminuent significativement en taux, suggérant leur rôle dans la surveillance de la maladie.

En cas d'absence de traitement, la brucellose peut devenir chronique et persiste toute une vie causant des déséquilibre physiologique et des complications ostéo-articulaires. (Young *et al.*, 2008) La capacité de *Brucella* à établir une infection chronique suggère l'existence d'un facteur de virulence à effets immuno-modulateurs capable de modifier la réponse immunitaire de l'hôte. (Juan M. *et al.*, 2014) il s'agit du facteur PrpA (Proline Racemase Protein). Ce dernier est sécrété lors de la infection, interagit avec NMMII-A des macrophages et induit la sécrétion des facteurs de prolifération des LB in vitro (Septra *et al.*, 2006 ; Septra *et al.*, 2013). Ce même facteur virulent a son homologue chez *Trypanosoma Cruzi* et agit comme inducteur de prolifération des LB indépendamment des LT (Reina-San-Martin *et al.*, 2000 ; Chamond *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter suite aux résultats d'une étude que les cellules T de bovins, de souris et de chameaux présentent un profil cytokinique similaire après une stimulation avec *B. abortus*, suggérant une réponse immunitaire similaire dans ces trois espèces animales, ce qui affirme les résultats sur les humains dans l'étude de l'immunité contre la brucellose. Cela suggère que les réponses en cytokines de la voie Th1 pourraient être essentielles dans la lutte contre les agents pathogènes intracellulaires (Seder *et al.*, 2000).

Juan M. *et al.* ont démontré que le facteur virulent PrpA est responsable de l'accroissement du nombre des LB chez le model murin, in vivo ce même facteur renforce la production des immunoglobuline dirigées contre le pathogène *Brucella*, et que ces anticorps vont causer l'infection des macrophages et par la suite les induire à sécréter plus de cytokines pro-inflammatoire. Ce qui explique la corrélation trouvée entre les anticorps IgM, IgA et IgG et le taux du TNF- α .

Conclusion

La présente étude a été conçue dans le but de démontrer que lors d'une infection à brucella qui est une bactérie à multiplication intracellulaire, les taux de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α chez des patients atteints d'une brucellose sont beaucoup plus élevés que la normale par rapport aux individus témoins et que ces taux ne sont pas liés au sexe ou à l'âge des patients. Ainsi que pour comparer les taux du TNF- α chez les patients atteints d'infection à brucella avant et après traitement.

le TNF- α est induit par la stimulation des macrophages après activation par des bactéries (Ladel et al., 1997 ; Zhan et al., 1995). C'est une cytokine clé dans l'activation des cellules immunitaires (Bancroft et al., 1993), ceci indique que le TNF- α agit comme une épée à double tranchant, contribuant à la fois à l'immunité et à l'immunopathologie et qu'il est nécessaire pour la résistance contre l'infection à *Brucella* spp. et contre les réponses immunitaires aux bactéries et aux parasites intracellulaires en général. Il est par contre raisonnable de supposer que le développement optimal et le maintien d'une réponse protectrice contre les infections reposent sur un équilibre de cytokines finement régulé, plutôt que sur le niveau d'une seule cytokine.

Sur la base de nos résultats et en cohérence avec d'autres études, nous concluons que les infections à *Brucella* spp. induisent une forte sécrétion en TNF- α qui est une cytokine principale de l'inflammation, et que ces taux sont plus élevés chez les patients atteints d'une brucellose par rapport au groupe témoin, on a trouvé aussi que les taux du TNF- α ne sont pas liés à l'âge ou aux sexes des patients.

Nos résultats ont donc confirmé que le TNF- α est impliqué dans la pathophysiologie de la brucellose et qu'il a une relation étroite avec l'activation inflammatoire de la maladie. Compte tenu des résultats actuels, il est suggéré que le TNF- α peut être utilisé pour surveiller la brucellose. Bien que ce soit le premier rapport en Algérie dans ce domaine, d'autres études avec un nombre plus élevé de cas devraient être entreprises.

Perspectives :

-Refaire l'étude avec un nombre plus élevé de patients et de témoins.

-Evaluation des taux du TNF- α avant et après traitement.

-Dosage de plusieurs cytokines à la fois telles que l'IL-12 et l'IFN- γ afin de mieux comprendre les mécanismes immunitaires impliqués lors d'infection à *Brucella* et de pouvoir contrôler cette infection par un traitement ou un vaccin.

-Elargir le territoire d'extraction des échantillons tout en prenant le même nombre de chaque région avec des nombres équitables des deux sexes.

-Refaire le travail en effectuant une cryométrie en flux qui vise à évaluer le taux des macrophages dans le sang périphérique des personnes infectés.

-Puisqu'il nous a été difficile d'avoir un groupe témoin ne présentant aucune maladie ou les moindres symptômes d'inflammation mais présentant quand même des taux très élevés en TNF- α on suggère de refaire le travail tout en dosant le TNF- α chez des personnes saines et de prévoir la cause d'augmentation des taux de cette cytokine pro-inflammatoire et pro-tumorale chez des personnes saines afin de prévenir contre l'apparition des cancers chez la population algérienne.

Références Bibliographiques

- A.M. Van Furth, E.M. Verhard-Seijmonsbergen, R. Van Furth et J.A. M. Langermans 1994. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF- α , IL-1 β and IL-10 by human leucocytes. *Immunology* 91 193-196
- Aggarwal, B. B., B. Moffat, and R. N. Harkins., 1984: Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem*, 259:686-691.
- Aggarwal, B. B., W. J. Henzel, B. Moffat, W. J. Kohr, and R. N. Harkins., 1985: Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J Biol Chem*, 260:2334-2344.
- Ahmed, K., Al-Matrouk, K.A., Martinez, G., Dishy, K., Rotimi, V.O. and Nagatake, T., 1999: Increased serum levels of interferon gamma and interleukin-12 during human brucellosis. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 61, 425:427.
- Al-Dewan, A. B. T. 2007. The occurrence of Brucellosis in Basrah City. M.Sc. Thesis, College of Veterinary medicine. University of Basrah.
- Alexandra Mailles et Véronique Vaillant. Etude sur les brucelloses humaines en France métropolitaine, 2002 – 2004
- Allenbach, C., P. Launois, C. Mueller, and F. Tacchini-Cottier., 2008: An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol.* 38:720-731.
- Allie, N., L. Alexopoulou, V. J. Quesniaux, L. Fick, K. Kranidioti, G. Kollias, B. Ryffel, and M. Jacobs., 2008: Protective role of membrane tumour necrosis factor in the host's resistance to mycobacterial infection. *Immunology*.
- Aversa, G., J. Punnonen, and J. E. De Vries., 1993: The 26-kd transmembrane form of tumor necrosis factor alpha on activated CD4⁺ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *J Exp Med.* 177:1575-1585.
- Ashleigh H., Christina T., Simon B., Natasha S., Xuemei W., Christine M. Graham, Jiawen Z., Margarida S., Ricciardi-Castagnoli P., Gregory J., Bancroft and Anne O., 2016 : Differential Production of Type I IFN Determines the Reciprocal Levels of IL-10 and Proinflammatory Cytokines Produced by C57BL/6 and BALB/c Macrophages. *J Immunol.* 197 (7) 2838-2853.
- Bates, D. O., and S. J. Harper., 2002: Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol.* 39:225-237.
- Benhabyles N., 5 décembre 1999 : Reflet de la situation épidémiologique 10ans déjà ! Relevé épidémiologique mensuel. volume 2, p: 177.
- Beutler, B., D. Greenwald, J. D. Hulmes, M. Chang, Y. C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch, and A. Cerami., 1985: Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature.* 316:552-554.
- Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, G. R. Majeau, W. Fiers, R. S. Cotran and M. A. Gimbrone, Jr., 1986: Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4533-4537.
- Black, R. A., 2002: Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:1-5. 24.

- Bossi P, Tegnell A, Baka A, Van Loock F, Hendriks J, Werner A, Maidhof H, Gouvras G., 2004 Dec 15: Task Force on Biological and Chemical Agent Threats, Public Health Directorate, European Commission, Luxembourg. Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-related brucellosis. *Euro Surveill.*9(12):E15-6.
- Brendon W. Smith Jana Strakova Jennifer L. King John W. Erdman Jr and William D. O'Brien Jr., 2010: Validated Sandwich ELISA for the Quantification of von Willebrand Factor in Rabbit plasma. *Biomarker insights*: 5 119–127.
- Brennan, F. M., D. Chantry, A. Jackson, R. Maini, and M. Feldmann., 1989: Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2:244-247.
- Buddle, M. B. J., 1956: Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *Hygiene*. 54: 351–351.
- Caron E., T Peyrard., S Köhler., S Cabane., J P Liautard., and J Dornand., 1994 : Live *Brucella* spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. *Infect Immun*, 62(12): 5267–5274.
- Clara DEGOS. 2014. Contrôle et modulation de la réponse immunitaire par *Brucella abortus*. L'université d'aix Marseille.
- Carmichael LE., 1967 : Canine brucellosis: isolation, diagnosis, transmission. *Proc Annu Meet US Anim Health Assoc*;71:517–527.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.
- Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A, Degrave WM, et al. 2005 Trypanosoma cruzi proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Mol Microbiol* 58:46e60.
- Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo., 2000: A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 288:2351-2354.
- Decker, T., M. L. Lohmann-Matthes, and G. E. Gifford. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol*. 138:957-962.
- Doğanay Mehmet et Bilgehan Aygen 2003 Human brucellosis: an overview. *International Journal of Infectious Diseases* V 7 173-182
- Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J. and Liautard, J.P., 1987: The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet. Microbiol.* 2002. 90, 383:394.
- Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J. and Liautard, J.P., 2002: The innate immune response against *Brucella* in humans. *Ve t. Microbiol.* 90, 383^394.
- Eissner, G., S. Kirchner, H. Lindner, W. Kolch, P. Janosch, M. Grell, P. Scheurich, R., 2000 :Andreesen, and E. Holler. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol*, 164:6193-6198.

- Eissner, G., W. Kolch, and P. Scheurich., 2004: Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:353-366.
- Erica D. Bernstein and Donna M. Murasko 1998. Effect of age on cytokine production in humans *Age, Vol. 21,137-151.*
- Feldmann, M., and R. N. Maini., 2003: Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med.* 9:1245-1250.
- Fernanda S. Oliveira, Natalia B. Carvalho, Ana Paula M. S. Brandao, Marco Túlio R. Gomes, Leonardo A. De Almeida, and Sergio C. Oliveira., Nov. 2011: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4 Is Essential for Initial Host Control of Brucella abortus Infection. *infection and immunity*, p. 4688–4695.
- Fernandes, D.M. and Baldwin, C.L., 1995: Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus. *Infect. Immun.* 63,1130:1133.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom., 1995: Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity.* 2:561-572.
- Fremont, C., N. Allie, I. Dambuza, S. I. Grivennikov, V. Yermeev, V. F. Quesniaux, M. Jacobs, and B. Ryffel., 2005: Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection. *Respir Res.* 6:136.
- Galanakis, E., Makis, A., Bourantas, K.L. and Papadopoulou, Z.L., 2002: Interleukin-3 and interleukin-4 in childhood brucellosis. *Infection.* 30, 33:34.
- Galustian, C., M. C. Labarthe, J. B. Bartlett, and A. G. Dalglish., 2004: Thalidomide-derived immunomodulatory drugs as therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther.* 4:1963-1970.
- Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon, and et al., 1994: Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*, 370:555-557.
- Giambartolomei, G.H., Delpino, M.V., Cahanovich, M.E., Wallach, J.C., Baldi, P.C., Velikovskiy, C.A. and Fossati, C.A., 2002: Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *Infect. Dis.* 186, 252:259.
- Giambartolomei, G.H., Delpino, M.V., Cahanovich, M.E., Wallach, J.C., Baldi, P.C., Velikovskiy, C.A. and Fossati, C.A., 2002: Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *J. Infect. Dis.* 186, 252^259
- Giraud, E., L. Primo, E. Audero, H. P. Gerber, P. Koolwijk, S. Soker, M. Klagsbrun, N. Ferrara, and F. Bussolino., 1998: Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 273:22128-22135.
- Godfroid J, Cloeckert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ., 2005 May-Jun: From the discovery of the Malta fever's agent

to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res.* 36(3):313-26.

- Golding, B., Scott, D.E., Scharf, O., Huang, L.Y., Zaitseva, M., Lapham, C., Eller, N. and Golding, H., 2002: Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 3, 43:48.
- Gommerman, J. L., and J. L. Browning. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3:642-655.
- Gon Y, Hashimoto S, Hayashi S, Koura T, Matsumoto K, Horie T. 1996. Lower serum concentrations of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired production of cytokines by peripheral blood monocytes in the elderly. *Clin. Exper. Immunol.*, 106:120-126.
- Gorvel JP¹, Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.*;90(1-4):281-97.
- Grell, M., 1995: Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm*, 47:8-17.
- Grell, M., F. M. Becke, H. Wajant, D. N. Mannel, and P. Scheurich., 1998: TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol.* 28:257-263.
- Hasanjani Roushan MR, Ebrahimpour S., 2015: Human brucellosis: An overview. *Caspian J Intern Med*; 6: 46-7.
- Hehlgans, T., and K. Pfeffer., 2005: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 115:1-20. 35.
- Jiang, X. and Baldwin, C.L., 2002: Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 61, 124:134.
- Juan M. Spera, Diego J. Comerci, Juan E. Ugalde 2014. *Brucella* alters the immune response in a prpA-dependent manner *Microbial Pathogenesis* 67-68 8e13
- Keffer, J., L. Probert, H. Cazlaris, S. Georgopoulos, E. Kaslaris, D. Kioussis, and G. Kollias., 1991: Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J.*10:4025-4031.
- Kindler V¹, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell. Mar* 10;56(5):731-40.
- Klir, J. J., J. Roth, Z. Szelenyi, J. L. McClellan, and M. J. Kluger., 1993: Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat. *Am J Physiol.* 265:R512-517.
- Ksontini, R., S. L. Mackay, and L. L. Moldawer., 1998: Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg.* 133:558-567.
- Kutbettin Demirdag, Mehmet Ozden, Ahmet Kalkan, Ahmet Godekmerdan, S. Sirri Kilic. 2003. Serum cytokine levels in patients with acute brucellosis and their relation to the traditional inflammatory markers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 39 149 :153.

- Lakomy Daniela. 2010 : Modulation des cellules dendritiques et macrophages : implications dans le cancer et l'athérosclérose. *These pour obtention de doctorat universite de Bourgogne U.F.R de medecine.*
- Laura Stobie., Sanjay Gurunathan., Calman Prussin., David L., Sacks., Nicolas Glaichenhaus., Chang Y., Robert A. and Seder. 2000 : The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *PNAS.* 18; 97 (15): 8427–8432.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh., 2007: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7:678-689.
- Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo., 2001: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104:487-501.
- M.J. Corbel Et W.J. Brinley Morgan., 1982 : Classification du genre Brucella : la situation présente *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.1 (1), 291-300.*
- Mahdi A. Al-Musawi 2015. A Study on Prevalence of Brucellosis among Children and Adolescents in Missan Province-Iraq. *International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN (Online): 2319-7064*
- Maurin M., 2005 Jan: Brucellosis at the dawn of the 21st century. *Med Mal Infect.* 35 (1):6-16.
- Mehmet Ozden , Ahmet Kalkan , Kutbettin Demirdag , S Sirri Kilic , Affan Denk , Pinar Yuce. 2004. Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Patients With Acute Brucellosis. *Scand J Infect Dis* 36 (2), 109-113.
- Moreira, A. L., E. P. Sampaio, A. Zmuidzinis, P. Frindt, K. A. Smith, and G. Kaplan., 1993: Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mrna degradation. *J Exp Med.* 177:1675-1680.
- Nakane A 1992. Significance of endogenous cytokines in host defense against Listeria monocytogenes infection. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 47(6):747-57.
- Odbileg R, Pruevtseren B, Gantsetseg D, Boldbaatar B, Buyannemekh T, Galmandakh Z et al. 2008 Cytokine responses in camels (*Camelus bactrianus*). *J Vet Med Sci* 70: 197-201. 8.
- Pappas G¹, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. 2005. *Brucellosis N Engl J Med.* 352(22):2325-36
- Pardi, R., L. Inverardi, and J. R. Bender., 1992: Regulatory mechanisms in Leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunol Today.* 13:224-230.
- Pasparakis, M., L. Alexopoulou, M. Grell, K. Pfizenmaier, H. Bluethmann, and G. Kollias., 1997: Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kda receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*94:6319-6323.
- Pennica, D., G. E. Nedwin, J. S. Hayflick, P. H. Seeburg, R. Derynck, M. A. Palladino, W. J. Kohr, B. B. Aggarwal, and D. V. Goeddel., 1984: Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 312:724-729.

- Peterson PK, Chao CC, Carson P, Hu S, Nichol K, Janoff 1994. Levels of tumor necrosis factor α , interleukin 6, interleukin 10, and transforming growth factor β are normal in the serum of the healthy elderly. *Clin. Infect. Dis.*, 19:1158-1159.
- Radovan Čekanac, Jovan Mladenović, Elizabeta Ristanović, Srđan Lazić; 2010. Epidemiological Characteristics of Brucellosis in Serbia, 1980-2008. *Croat Med J. 51(4): 337–344.*
- Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, et al. 2000 A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med* 6:890e7.
- Ribeiro-Rodrigues, R., Resende Co, T., Johnson, J.L., Ribeiro, F., Palaci, M., Sa, R.T., Maciel, E.L., Pereira Lima, F.E., Dettoni, V., Toossi, Z., Boom, W.H., Dietze, R., Ellner, J.J. and Hirsch, C.S. 2002 Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 818 :823.
- Ross H.M., Foster G., Reid R.J., Jahans K.L., MacMillan A.P., 1994: Brucella species infection in sea-mammals, *Vet. Rec* 134-359.
- Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lotscher, Y. Lang, P. Koebel, F. Kontgen, A. Althage, R. Zinkernagel, M. Steinmetz, and H. Bluethmann., 1993 : Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 364:798-802.
- Scheinfeld, N.A., 2004: comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor α blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J Dermatolog Treat* 15:280-294.
- Sedgwick, J. D., D. S. Riminton, J. G. Cyster, and H. Korner., 2000: Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today.* 21:110-113.
- Smith, C. A., T. Farrar, and R. G. Goodwin., 1994: The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* 76:959-962.
- Sohn A.H., Probert W.S., Glaser C.A., Gupta N., Bollen A.W., Wong J.D., Grace E.M., McDonald W.C., 2003: Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp., *Emerg. Infect. Dis.* 9 485–488.
- Spera JM, Herrmann CK, Roset MS, Comerci DJ, Ugalde JE. 2013 A Brucella virulence factor targets macrophages to trigger B-cell proliferation. *J Biol Chem* 288:20208e16.
- Spera JM, Ugalde JE, Mucci J, Comerci DJ, Ugalde RA. A. 2006 B lymphocyte mitogen is a Brucella abortus virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16514e9.
- Takeda, K., S. Iwamoto, H. Sugimoto, T. Takuma, N. Kawatani, M. Noda, A. Masaki, H. Morise, H. Arimura, and K. Konno., 1986: Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. *Nature.* 323:338-340.
- Tracey, D., L. Klareskog, E. H. Sasso, J. G. Salfeld, and P. P. Tak., 2008: Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 117:244-279.
- Vassalli, P., 1992: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411-452.

- Vemulapalli R¹, He Y, Cravero S, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. 2000. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. *Infect Immun.* 68(6):3286-9.
- Wallis, R.S., M.S. Broder, J.Y. Wong, M.E. Hanson, and D.O. Beenhouwer., 2004: Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis* 38:1261-1265.
- Ware, C. F., P. D. Crowe, M. H. Grayson, M. J. Androlewicz, and J. L. Browning., 1992: Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol.*149:3881-3888.
- Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara., 1989: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 169:1747-1756.
- Young EJ.2008 Family studies in brucellosis. *Infection* 36:578e9.
- Young, E.J., Borchert, M., Kretzer, F.L. and Musher, D.M., 1985: Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes.*J.Infe ct.Dis.*151, 682:690.
- Young, E.J., Borchert, M., Kretzer, F.L. and Musher, D.M., 1985: Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes.*J.Infe ct.Dis.*, 151, 682:690.
- Zhan Y¹, Lieschke GJ, Grail D, Dunn AR, Cheers C. 1998. Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood.* Feb 1;91(3):863-9.
- Zhan, Y., Liu, Z. and Cheers, C., 1996: Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms.*Infe ct. Immun.* 64,2782:2786.
- Zhou, L. J., and T. F. Tedder., 1995: A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood.* 86:3295-3301.

Annexes

Résultats des tests sérologiques

Dosage des anticorps IgA, IgM et IgG par IFI

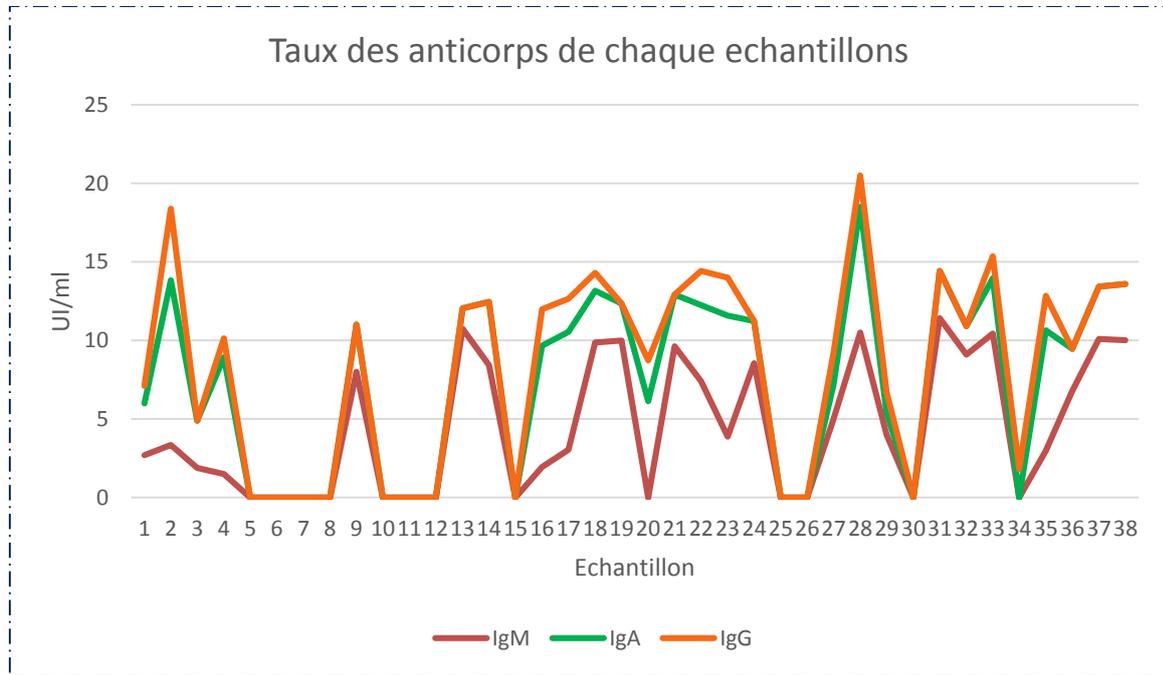


Figure 1: Résultats du dosage des anticorps par IFI chez les patients.

a- Epreuve à l'antigène tamponné

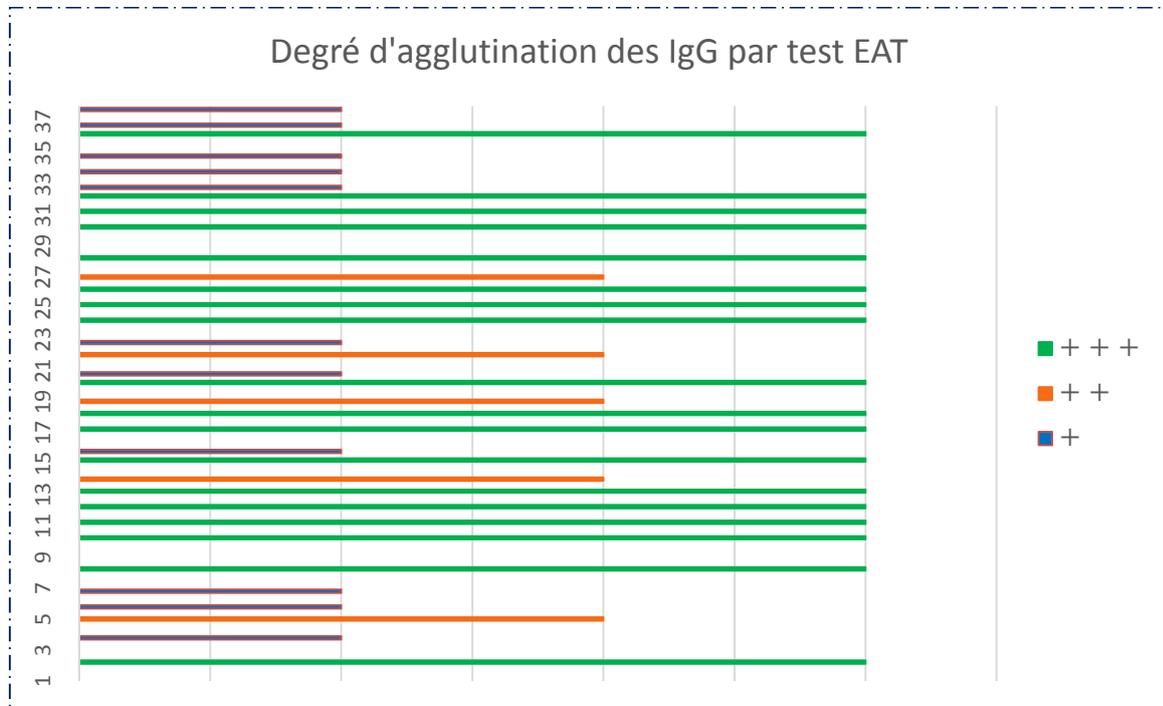


Figure 2 : Résultat de l'épreuve à l'antigène tamponné EAT

b- Séroagglutination de Wright

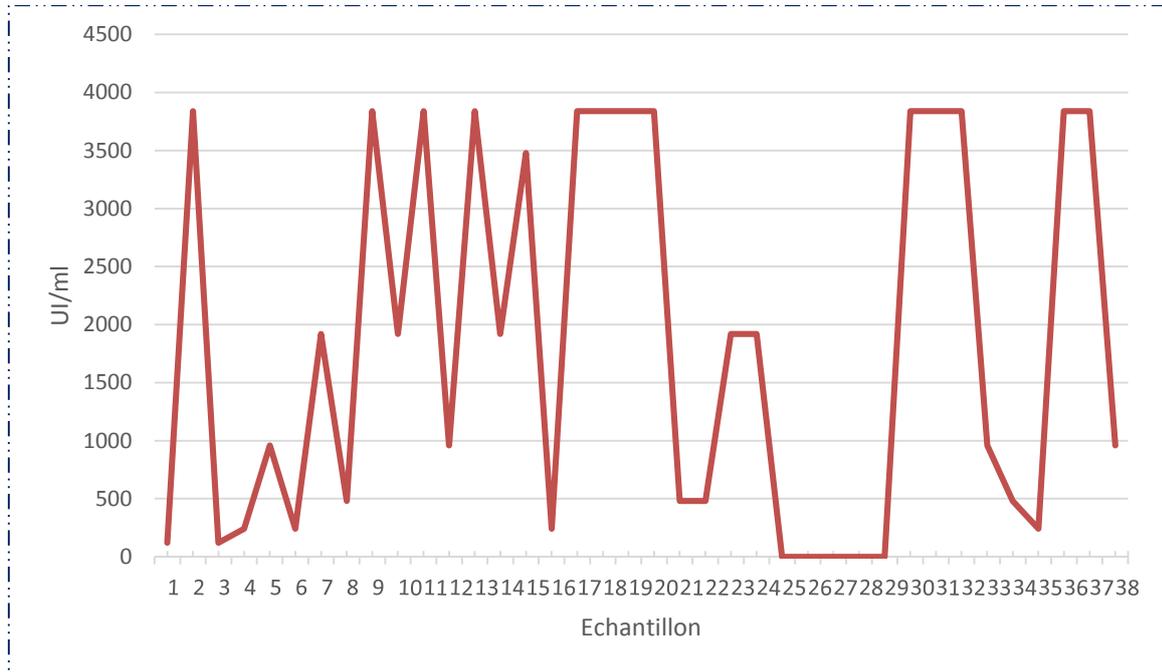


Figure 3 : Résultat de la séroagglutination de Wright

1. Photographique

a. Les sérums des patients

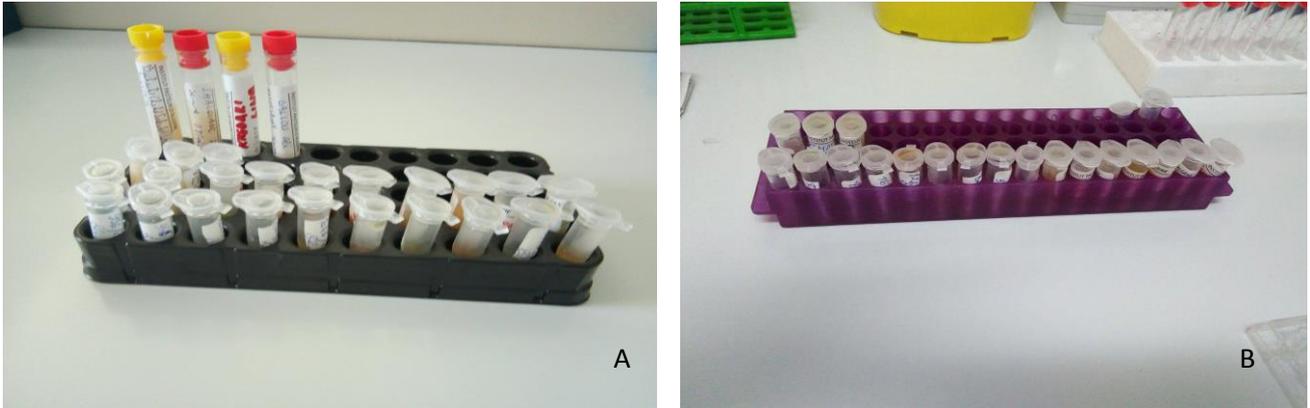


Figure 1 : A : Eppendorfs contenant les sérums des patients atteints de Brucellose aigue ; **B :** deuxieme portoir contenant des eppendorfs rempli de sérums des patients atteints de brucellose aigue.

b. La pesé des constituants chimiques du PBS



Figure 2 : prise de 0.2g de KCl.

c. L'agitation du PBS

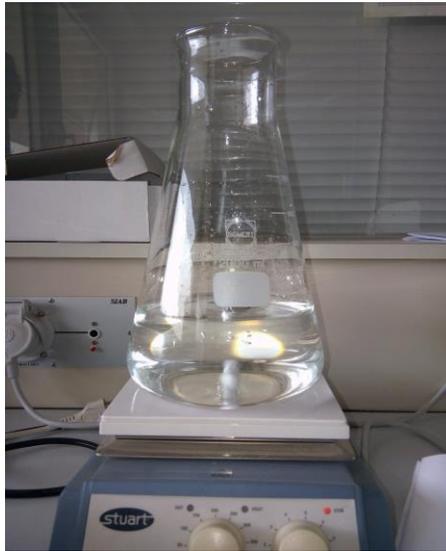


Figure 3 : incorporation des constituants chimiques du PBS dans de l'eau distillée à l'aide d'un agitateur.

d. Mesure du PH du PBS



Figure 4 : La mesure du PH du PBS à l'aide d'un PH-mètre d'où un PH de 7.2 à été ajusté en ajoutant du NaOH.

e. Les constituants en poudre du PBS

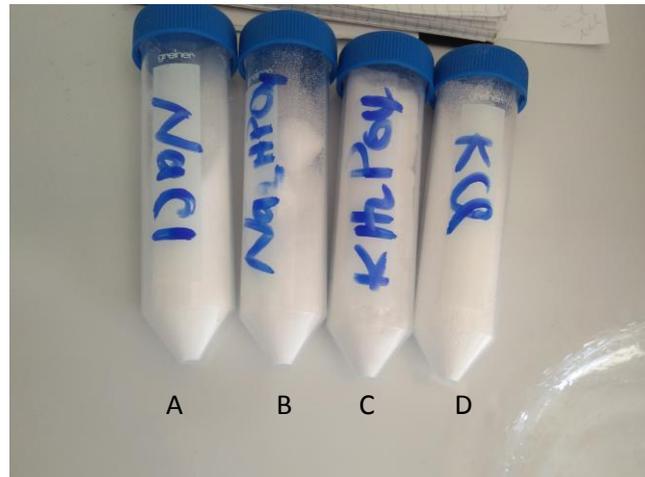


Figure 5 : Constituants chimiques du PBS, **A :** NaCl ; **B :** Na₂HPO₄ ; **C :** KH₂PO₄ ; **D :** KCl.

f. Lavage de la microplaque



Figure 6 : Procédure de lavage de la microplaque d'où l'élimination des excès de dépôt.

g. Dépôt du substrat



Figure 7 : La coloration des puits en bleu après dépôt du substrat et incubation pendant 20 minutes.

h. Dépôt de la solution stop



Figure 8 : La coloration des puits en jaune après dépôt de la solution stop et incubation pendant 20 minutes.

i. Lecture des résultats

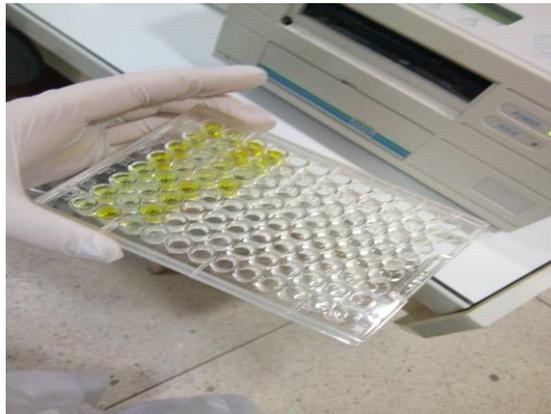


Figure 9 : La lecture des résultats des taux de $\text{TNF-}\alpha$ à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450nm.

2. Produits chimiques

Les différentes préparations des solutions ont été faites selon le protocole proposé avec le kit Elisa que nous avons utilisé pour la réalisation de nos expériences.

a. Préparation du PBS



Figure 10 : La solution PBS.

Etapes de préparation pour 1L de PBS

Dans un erlenmeyer on verse 1000ml d'eau distillée et on rajoute 1.15 g/l de Na_2HPO_4 , 0.204 g/l de KH_2PO_4 , 0.2 g/l de KCl et 7.9 g/l de NaCl , on met le mélange sur un agitateur et on laisse pour environ 5mn afin de bien les dissoudre, à l'aide d'un PH-mètre on mesure le PH et on l'ajuste en utilisant du NaOH jusqu'à l'obtention d'un PH neutre entre 7.2 et 7.4.

b. réparation du réactif diluant



Figure 11 : Pot de gaz rempli de réactif diluant.

Etapes de préparation du réactif diluant

Le réactif diluant est fait à base de 1% de BSA dans 100ml de PBS et donc pour préparer 200ml de ce dernier on prend 2ml de BSA et on la met dans un pot de gaz contenant 198ml de PBS.

c. Préparation de la solution de lavage



Etapes de préparation de solution de lavage

Pour préparer la solution de lavage il faut 0.05% de la solution tween dans 100ml de PBS et donc pour avoir un volume de 360ml on met 180 μ l de la solution tween dans une pissette rempli de 342ml de PBS.

Figure 12 : pissette de solution de lavage.

d. Tween20

Utilisé dans le tampon de lavage afin d'éliminer les interactions non spécifiques des anticorps.

e. BSA

Utilisé comme constituant pour le réactif diluant et pour la saturation.

f. Le substrat tetramethylbenzidine ou (TMB substrate solution) :

C'est un chromogène utilisé comme révélateur de la peroxydase. Après action de la peroxydase, le TMB prend une coloration bleue dont l'absorbance peut être mesurée à 450 nm ou entre 540 et 570 nm, il est photosensible et doit être gardé à l'abri de la lumière.

g. La solution stop 2 NH₂SO₄ :

La réaction de la peroxydase est arrêtée par l'ajout d'acide chlorhydrique 2M ou d'acide sulfurique 1M. Dans ce cas, le produit formé par le TMB sous l'action de la peroxydase prend une couleur jaune que l'on peut mesurer à 450 nm.



Figure 13 : Produits non fournis par le kit **a** : tween 20 ; **b** : la BSA ; **c** : le substrat ; **d** : la solution stop (**laboratoire d'immunologie cellulaire IPA**)

h. Dilution de la streptavidine

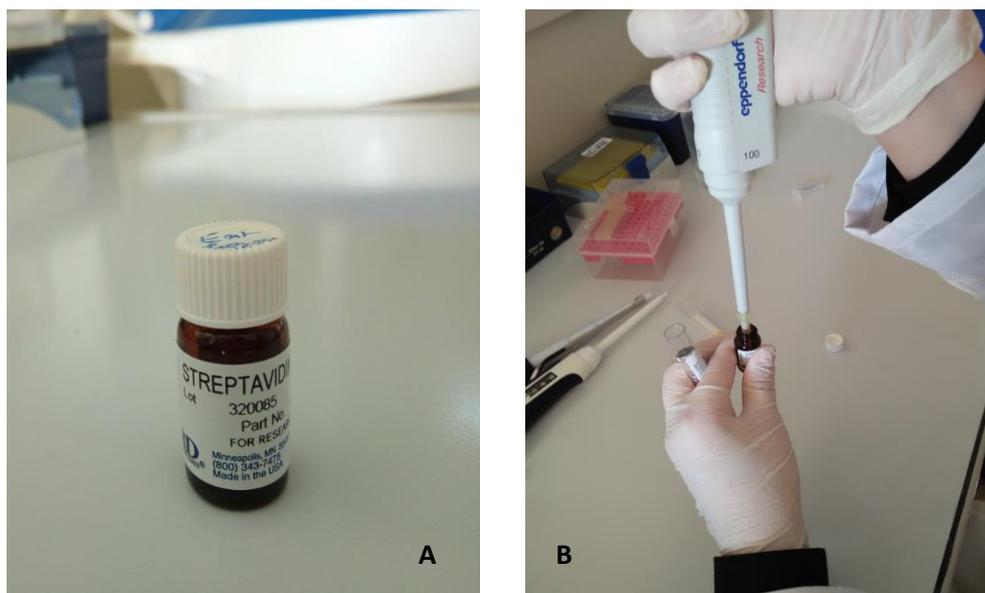


Figure 14 : **A** : Flacon de la streptavidine-HRP ; **B** : Transfert de la streptavidine pure dans un tube contenant du réactif diluant et couvert avec du papier aluminium.

Etapes de dilution de la streptavidine-HRP

Pour avoir de la streptavidine prête à l'utilisation il faut prendre 1 μ l de streptavidine pure pour 40ml de réactif diluant et donc pour avoir un volume de 6000 μ l on ajoute 150 μ l de streptavidine pure à 5850 μ l de réactif diluant.

i. Dilution des anticorps de capture anti-TNF- α humain

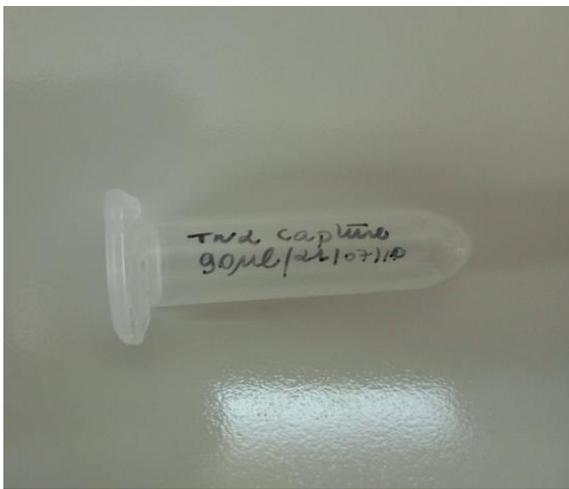


Figure 15 : Eppendorf de 90 μ l d'anticorps de capture anti-TNF- α -humain.

Etapes de dilution des anticorps de capture anti-TNF- α humain

Afin d'avoir un volume de 6000 μ l d'anticorps de capture anti-TNF- α humain dilué on met 50 μ l d'anticorps de capture dans un tube contenant 5950 μ l de PBS.

j. Dilution des anticorps de détection anti-TNF- α humain

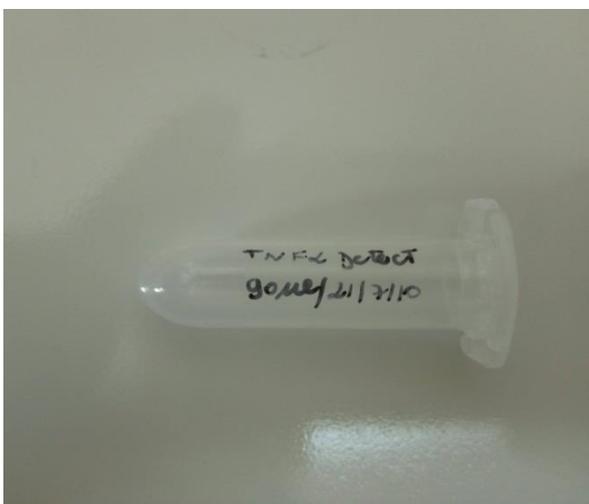


Figure 16 : Eppendorf de 90 μ l d'anticorps de détection anti-TNF- α -humain.

Etapes de dilution des anticorps de détection anti-TNF- α humain

Pour préparer un volume de 6000 μ l d'anticorps de détection dilué on met 100 μ l d'anticorps de détection dans un tube contenant 5900 μ l de réactif diluant.

k. Dilution du standard de TNF- α humain

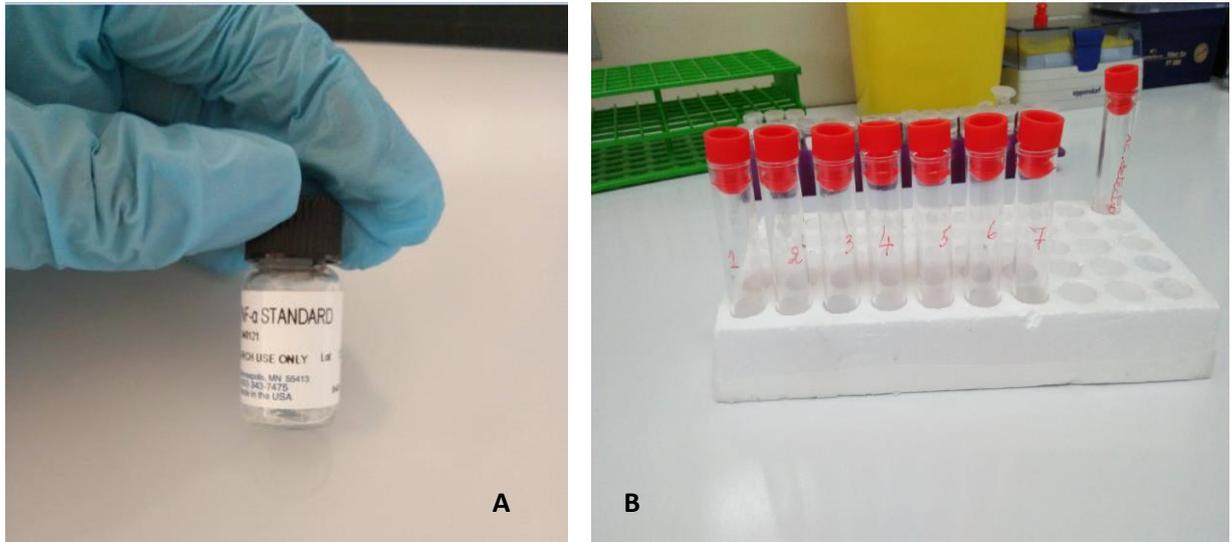


Figure 17 : A : Flacon du standard de TNF- α humain ; B : Tubes des différentes concentrations des standards de TNF- α humain.

Étapes de dilution du standard de TNF- α humain

Tous les tubes doivent être rempli de 500 μ l de réactif diluant à part le premier tube dont on remplit avec 999.97 μ l de réactif diluant et on ajoute 27*10⁻³ μ l du standard de TNF- α humain, on vortex le premier tube et on prend 500 μ l de ce dernier pour la mettre dans le deuxième tube qui contient lui aussi 500 μ l de réactif diluant on vortex et on refait les même étapes avec les cinq tubes restants afin d'avoir une diminution de concentration qui servira d'étalon pour notre expérience.

3. Equipements

- a. **Centrifugeuse BRAi4 (Jouan)** : utilisé pour centrifugé le sang des patients afin de séparés ses constituants et d'en extraire le sérum pour l'analyser.



Figure 18 : La centrifugeuse dotée d'une capacité de 4100 tours/minutes.

- b. **Congélateur Jouan -80°C** : utilisé pour la congélation immédiate des sérums afin de conserver la cytokine TNF- α de notre étude.



Figure 19 : Congélateur à -80°C.

- c. **Balance KERN ABS220/4N** : utilisée pour peser les constituants chimiques en poudre. Une petite assiette en aluminium a été placée, ensuite la balance remis à zéro, chaque constituant a été pesé individuellement.



Figure 20 : La balance dont la capacité maximale est de 220g.

- d. **PH-mètre METTLER TOLEDO** : utilisé pour mesurer le PH des solutions utilisés pour nos expériences.

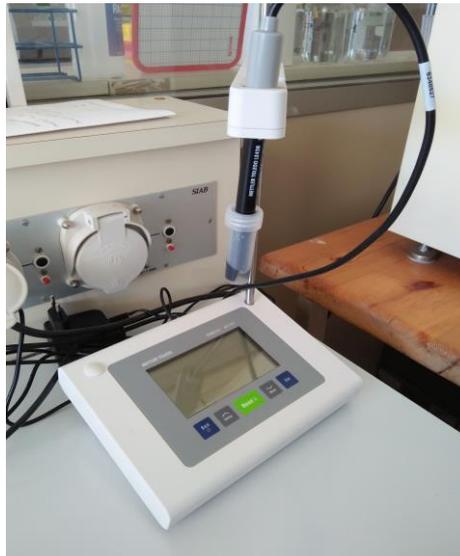


Figure 21 : Le PH-mètre.

- e. **Fisherbrand ZX3 vortex mixer** : utilisé pour vortexer les solutions mises dans des tubes en verre lors des dilutions.



Figure 22 : Le vortex.

- f. **Agitateur Stuart** : utilisé pour mélanger les solutions préparées pour avoir une homogénéité et une incorporation des constituants solides dans le liquide.



Figure 23 : L'agitateur.

- g. La chambre Froide :** utilisée pour la conservation du PBS.



Figure 24 : La chambre froide.

- h. Réfrigérateur +4°C :** utilisé pour la conservation du substrat-TMB, de la solution stop et de la streptavidine-HRP.



Figure 25 : Le réfrigérateur +4°C.

- i. Le spectrophotomètre :** utilisé pour mesurer l'absorbance à 450nm qui est proportionnelle à la concentration du TNF- α présent dans chaque puits.



Figure 26 : Le spectrophotomètre.

4. Instruments

- a. **La verrerie** : Le Pot de gaz à été utilisé pour préparer le réactif diluant et le conserver a +4°C dedans, l'erenmeyer pour la préparation du PBS et pour sa conservation dans la chambre froide. Tandis que les tubes étaient utilisés pour préparer les dilutions des standards du TNF- α , la dilution de la streptavidine et pour les dilutions d'anticorps de capture et de détection anti-TNF- α humain.

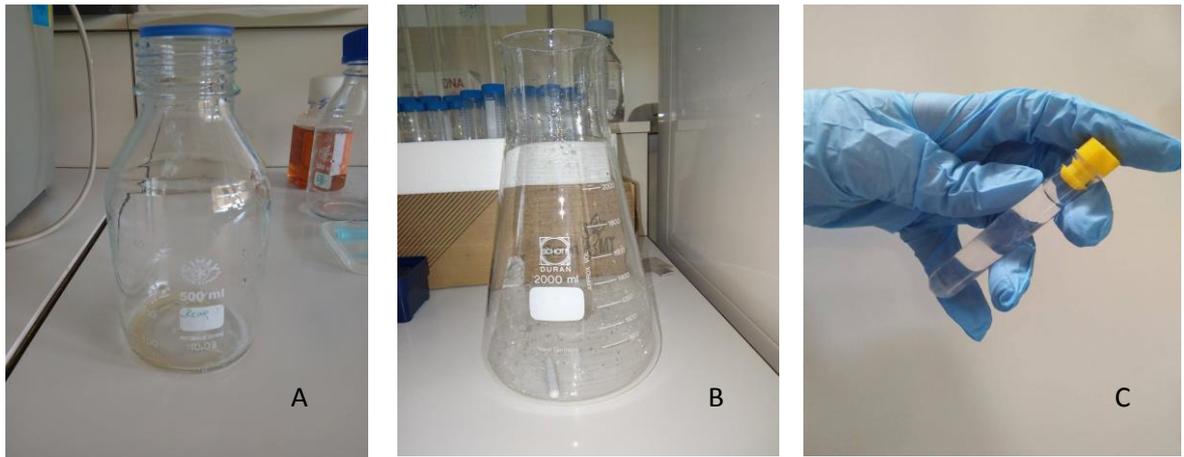


Figure 27 : A : le pot de gaz ; B : l'erenmeyer ; C : le tube.

- b. **Les eppendorfs** : utilisé pour mettre le sérum des patients et le conserver dedans.



Figure 28 : Eppendorf.

c. **Les micropipettes** : utilisées pour le pipetage des différentes solutions de notre expérience.

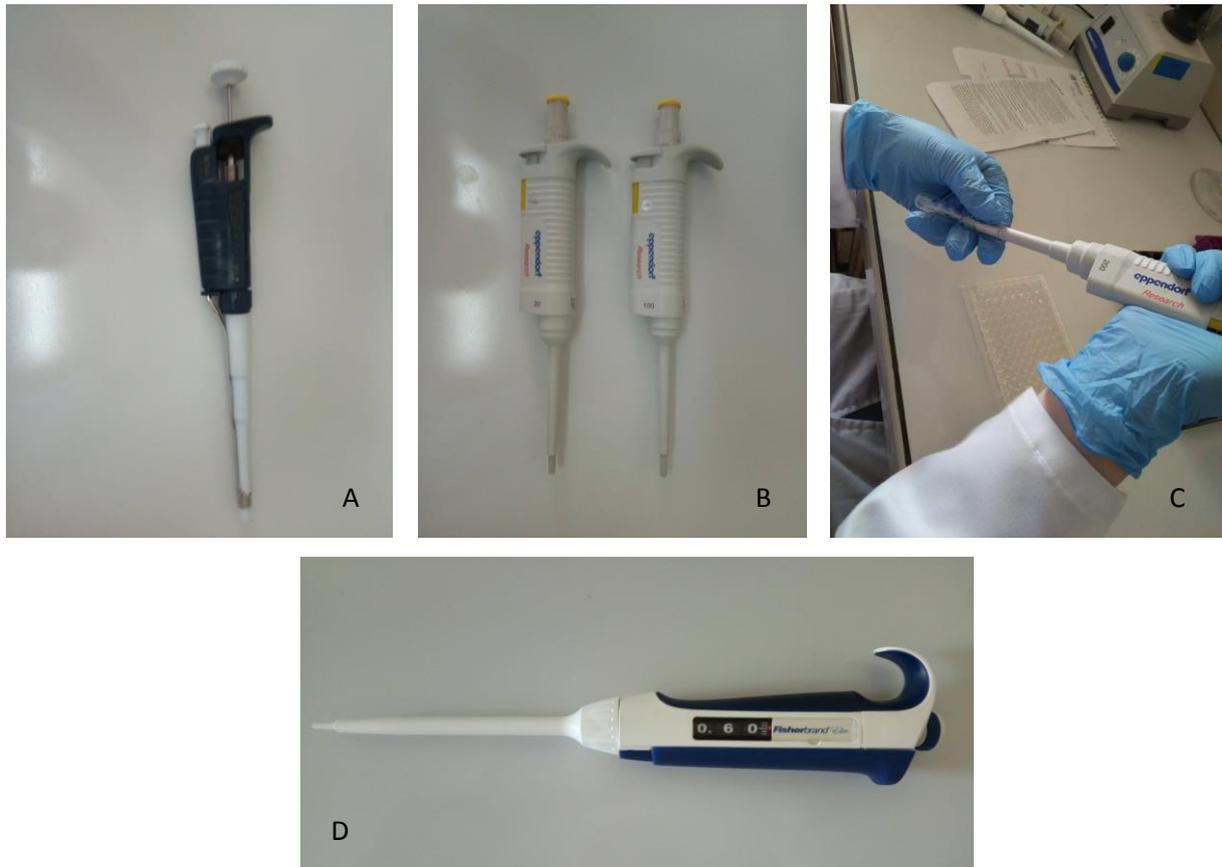


Figure 28 : A : micropipette eppendorf de 1000µl ; B : de droite à gauche micropipette eppendorf de 100µl et de 20µl ; C : micropipette eppendorf de 200µl ; D : micropipette Fisherband de 10µl.

d. **La pissette** : utilisée pour la préparation et l'usage de la solution lavage.



Figure 29 : La pissette de volume de 100ml.

5. Consommable

- a. **Les microplaques costar** : pour quantifié le taux de TNF- α après la préparation de la plaque par les différentes incubations (coating des anticorps de capture, dépôt des sérums, des standards, des anticorps de détection, de la streptavidine, du substrat et de la solution stop).

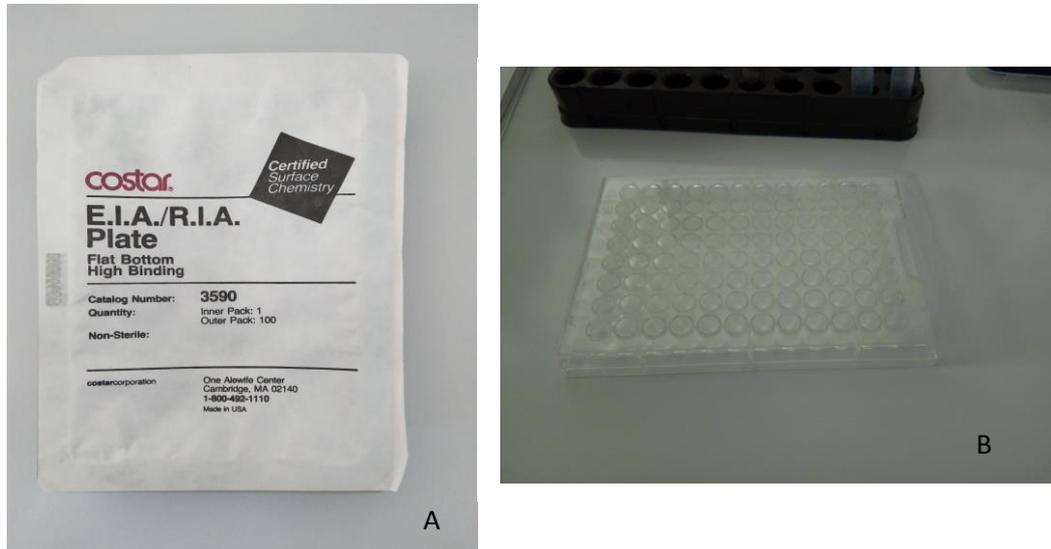


Figure 30 : A : la microplaque couverte ; B : la microplaque sans couverture.

- b. **L'adhésif** : utilisé pour couvrir la microplaque lors des incubations (avec les anticorps de capture, des sérums, des anticorps de détection et de la streptavidine).

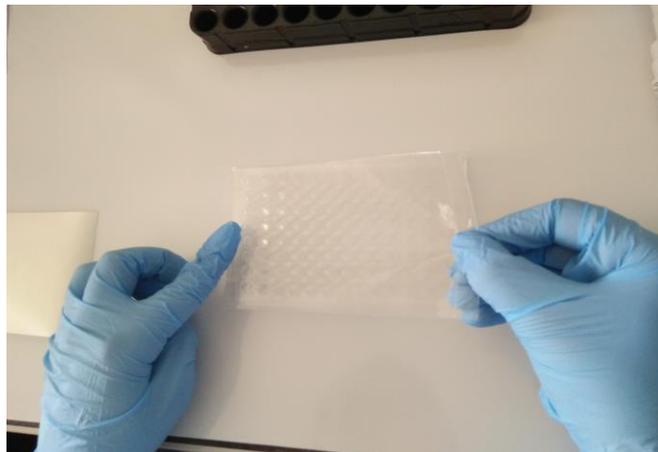


Figure 31 : l'application de l'adhésif sur la microplaque pour une incubation.

c. **Les embouts eppendorf** : utilisé afin d'assurer le pipetage des solutions.

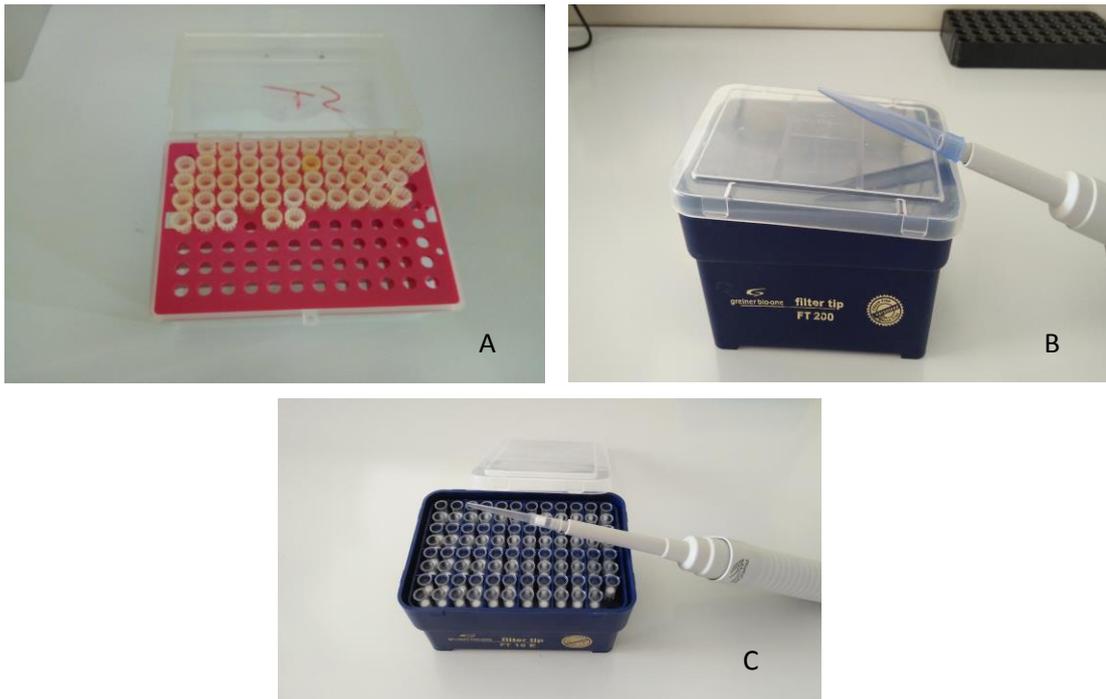


Figure 32 : A : les embouts jaunes conçu pour les micropipettes de 20 μ l, 100 μ l et 200 μ l ; B : les embouts bleus conçu pour la micropipette de 1000 μ l ; C : les embouts transparents pointus conçu pour la micropipette de 10 μ l.

d. **Les gants Latex** :



Figure 33 : Les gants utilisés au laboratoire.

6. Graphique

a. Génétique d'évaluation des anticorps

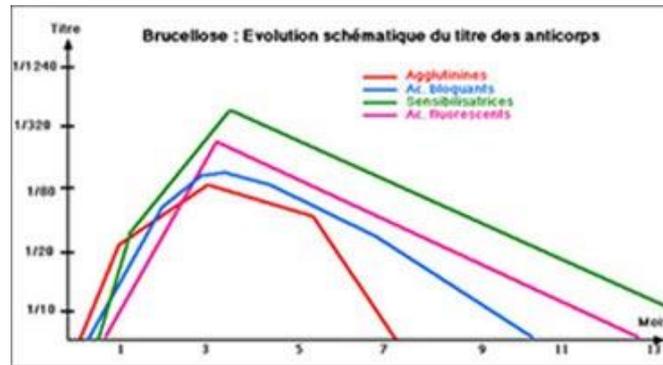


Figure 34 : Evolution schématique du titre des anticorps durant l'infection à *Brucella*.

b. Cinétique d'évolution des anticorps

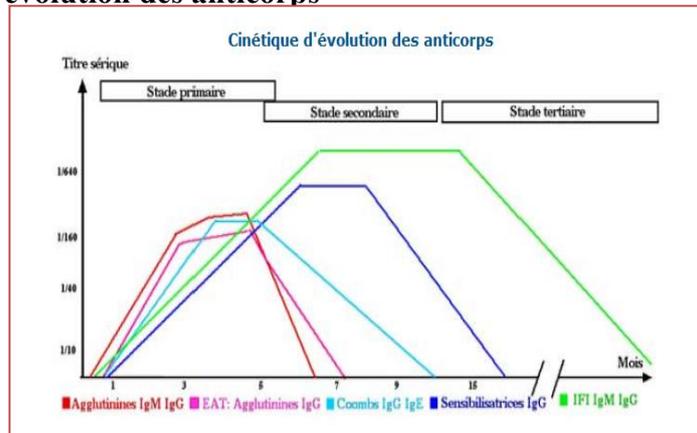


Figure 35 : Cinétique d'évolution des anticorps durant l'infection à *Brucella*

c. Courbe d'étalonnage

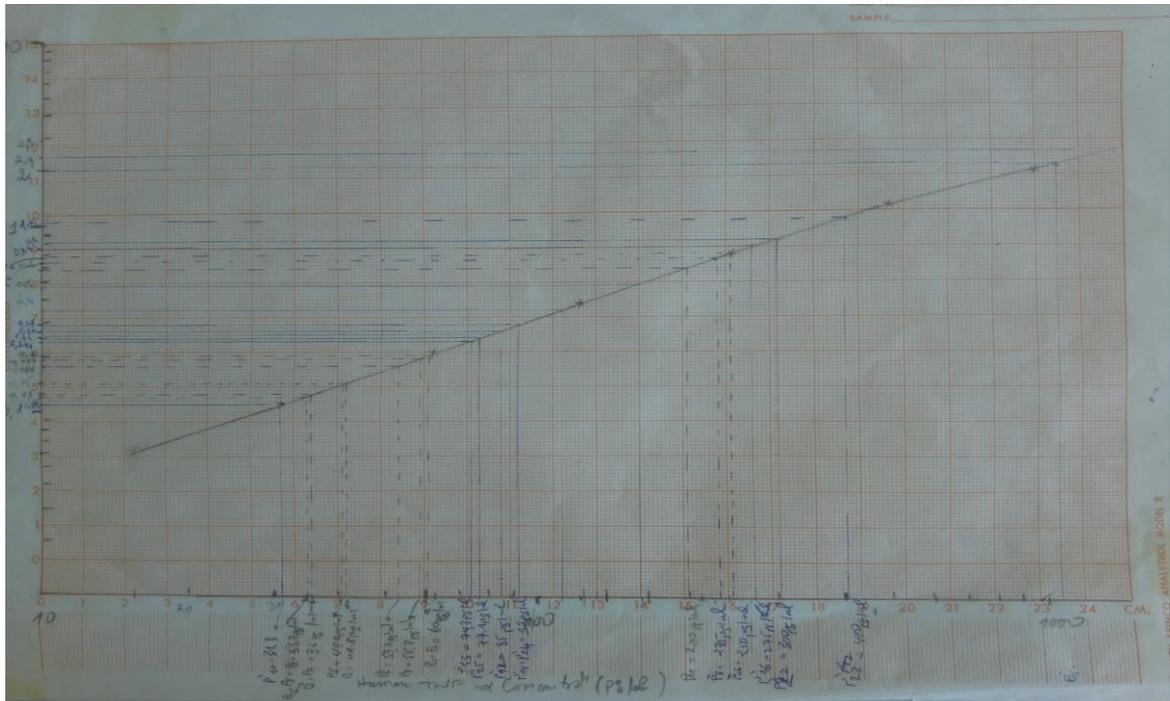


Figure 36 : Courbe d'étalonnage et d'extrapolation des valeurs de la D.O.

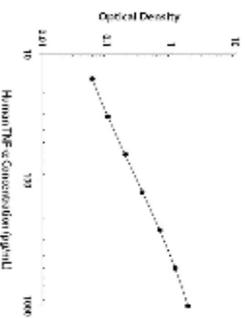
Human TNF- α

(Catalog Number: DVT210-05 (5 plates)
DVT210 (15 plates))

Average the duplicate readings for each standard control and sample and subtract the average zero standard optical density (OD). Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4 PL) curve fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the human TNF- α concentrations versus the log of the OD, and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is only for demonstration purposes. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.



SPECIFICITY

The following factors prepared at 50 ng/ml were assayed and exhibited no cross-reactivity or interference:

Factor	Other reagents
TNF- β	Human TNF- α
TNF-RI	Human TNF- α
TNF-RII	Human TNF- α
TNF- α	
TNF-RI	
TNF-RII	

• We recommend the use of R&D Systems' Reagent Diluent Concentrate 2 (Catalog # DY995) to prepare Reagent Diluent for use in this assay.

• The use of high quality bovine Serum Albumin (BSA) for the Reagent Diluent is crucial for the optimum performance of the DuoSet ELISA Development Kit. Impurities such as proteases, binding proteins, soluble receptors or other interfering substances can be found to varying degrees in virtually all BSA preparations and can inhibit or interfere with the detection of certain analytes. If the standard curve appears suppressed, consider evaluating a different preparation of BSA.

• It is suggested to start Reagent Diluent optimization for serum and plasma samples by using PBS-sample matrix with 10-50% animal serum. Do not use buffers with animal serum to reconstitute or dilute the Detection Antibody or Streptavidin-HRP.

• It is important that the Reagent Diluent selected for reconstitution and dilution of the standard reflect the environment of the samples being measured.

- Avoid microbial contamination of reagents and buffers.
- A thorough hand wash is essential for proper assay performance. Wash buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by pipette or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by lining the plate and blotting it against clean paper towels.
- Individual results may vary due to differences in technique, plasticware and water sources.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.

• The use of PBS from tablets may interfere in this assay.

TROUBLESHOOTING

Notes: For more detailed troubleshooting, please visit:

www.RnDSystems.com/ELISATroubleshooting

- | | |
|--|--|
| <p>Poor Standard Curve</p> <ul style="list-style-type: none"> • Impure BSA used for Reagent Diluent preparation. • Improper reconstitution and/or storage of standard. • Improper dilution of highest standard standard curve. • Incomplete washing and/or aspiration of wells. • Unequal volumes added to wells pipetting error. • Incorrect incubation times or temperatures. | <p>Poor Precision</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unequal volumes added to wells pipetting error. • Incomplete washing and/or aspiration of wells. • Unequal mixing of reagents as plation of wells. • Inadequate volume of substrate added to wells. • Incorrect incubation times or temperatures. • Impure BSA used for Reagent Diluent preparation. |
|--|--|

INTENDED USE

For the detection of sandwich ELISAs to measure natural and recombinant human Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α). The Reagent Diluent recommended may be suitable for most cell culture supernate, serum, and plasma samples. The Reagent Diluent selected for use can alter the performance of an immunoassay. Reagent Diluent optimization for samples with complex matrices such as serum and plasma, may improve their performance in this assay.

- The kit contains sufficient materials for an ELISA on at least five 96 well plates, provided the following conditions are met:
- The reagents are prepared as described in this package insert.
 - The assay is run as described in the General ELISA Protocol.
 - The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

This package insert must be read in its entirety before using this product. Be it no the Certificate of Analysis for complete concentrations they may vary for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

ALWAYS READ AND FOLLOW DIRECTIONS

USA & Canada | R&D Systems, Inc.
514 McKinley Plaza, 11C, Minneapolis, MN 55412, USA
TEL: (800) 234-7975 (612) 770-2085 FAX: (612) 855-4400
E-MAIL: info@RnDSystems.com

REGIONS & COUNTRIES

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.
19 Barrow Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3RN, UK
TEL: +44 (0) 1235 529449 FAX: +44 (0) 1235 571400
E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.
2441 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yunnan Road, Shanghai, PRC 200050
TEL: +86(21) 52280072 FAX: +86(21) 52271001
E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

www.RnDSystems.com



7. Protocole

OTHER MATERIALS & SOLUTIONS REQUIRED

DuSet Antiliver Reagent Kit 2 (5 plates):

R&D Systems Catalog # DY008) containing 96 well microplates, plate sealers, substrate solution, stop solution, plate coating buffer (pBS), wash buffer, and Reagent Diluent Concentrate 2.

The components listed above may be purchased separately.

96 well microplates: (R&D Systems Catalog # DY990).

Plate Sealer: (R&D Systems Catalog # DY992).

pBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 μm filtered. (R&D Systems Catalog # DY006).

Wash Buffer: 0.05% Tween™ 20 in pBS, pH 7.2-7.4

(R&D Systems Catalog # WA126).

Reagent Diluent: 1% BSA in pBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm filtered (R&D Systems Catalog # DY995).

Quality of BSA is critical. (see Technical Hint).

Substrate Solution: 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (tetramethylbenzidine). (R&D Systems Catalog # DY999).

Stop Solution: 2 N H₂SO₄. (R&D Systems Catalog # DY994).

PRECAUTIONS

Some components in this kit contain ProClin™ which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. The Color Reagent B suggested for use with this kit may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Please refer to the MSDS on our website prior to use.

CALIBRATION

This Duo Set is calibrated against a highly purified, colt-expressed recombinant human TNF-α produced at R&D Systems.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8°C. Do not use past kit expiration date.

DESCRIPTION	PART #	CATALOG # DYNOS	CATALOG # DYN0	STORAGE/OPENED/ RECONSTITUTION
Human TNF-α Capture Antibody	86010	1 vial	3 vials	
Human TNF-α Detection Antibody	86020	1 vial	3 vials	Not to be used for (ChE) or suspension kits
Human TNF-α Standard	86071	1 vial	3 vials	
Syngene HRP	82075	1 vial	3 vials	

REAGENT PREPARATION

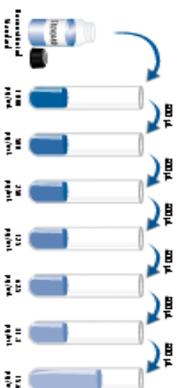
Bring all reagents to room temperature before use. Allow all components to rest for a minimum of 15 minutes with gentle agitation after initial reconstitution. Working dilutions should be prepared and used immediately.

Streptavidin-HRP: Each vial contains 2.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish peroxidase. Dilute to the working concentration to be specified on the vial label using Reagent Diluent.

Mouse Anti-Human TNF-α Capture Antibody: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 0.5 mL of pBS. Dilute in pBS without carrier protein to the working concentration indicated on the C of A.

Biotinylated Goat Anti-Human TNF-α Detection Antibody: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 1.0 mL of Reagent Diluent. Dilute in Reagent Diluent to the working concentration indicated on the C of A.

Recombinant Human TNF-α Standard: Refer to the lot-specific C of A for amount supplied. Reconstitute each vial with 0.5 mL of Reagent Diluent. A seven point standard curve using 2-6 h serial dilutions in Reagent Diluent is recommended. Prepare 1000 μL of high standard per plate assayed at the concentration indicated on the C of A.



GENERAL ELISA PROTOCOL

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to the working concentration in pBS without carrier protein. Immediately coat a 96-well microplate with 100 μL per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or auto washer. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 μL of Reagent Diluent to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 1 hour.
4. Repeat the aspirate/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

1. Add 100 μL of sample or standards in Reagent Diluent, or an appropriate diluent, per well. Cover with an adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
2. Repeat the aspirate/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Add 100 μL of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent, to each well. Cover with a new adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspirate/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Add 100 μL of the working dilution of Streptavidin-HRP to each well. Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
6. Repeat the aspirate/wash as in step 2.
7. Add 100 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
8. Add 50 μL of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.