

**Ministère de l'Éducation Nationale,
de l'Enseignement Supérieur et de
la Recherche Scientifique**

**République du Mali
Un Peuple Un But Une Foi**



**UNIVERSITÉ DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO**



**FACULTE DE PHARMACIE
(FAPH)**

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019-2020

Thèse N° :

TITRE

**CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE CHEZ
LES FEMMES ENCEINTES DANS LA COMMUNE V DU
DISTRICT DE BAMAKO**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le/...../.....devant
la Faculté de Pharmacie

Par M. Souleymane KABA

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

Jury

Président : Prof Souleymane DIALLO

Membres : Dr Djeneba SY

Dr Ousmane SANOGO

Dr Soumana Oumar TRAORE

Co-directeur : Dr Lassina DOUMBIA

Directeur : Prof Ousmane KOITA

**Ministère de l'Éducation Nationale,
de l'Enseignement Supérieur et de
la Recherche Scientifique**

**République du Mali
Un Peuple Un But Une Foi**



**UNIVERSITÉ DES SCIENCES, DES TECHNIQUES
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO**



**FACULTE DE PHARMACIE
(FAPH)**

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019-2020

Thèse N° :

TITRE

**CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE CHEZ
LES FEMMES ENCEINTES DANS LA COMMUNE V DU
DISTRICT DE BAMAKO**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le/...../.....devant
la Faculté de Pharmacie

Par M. Souleymane KABA

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

Jury

Président : Prof Souleymane DIALLO

Membres : Dr Djeneba SY

Dr Ousmane SANOGO

Dr Soumana Oumar TRAORE

Co-directeur : Dr Lassina DOUMBIA

Directeur : Prof Ousmane KOITA

LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2019-2020

➤ **ADMINISTRATION**

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH, Maitre de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des finances.

➤ **PROFESSEURS HONORAIRES**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Mahamadou	CISSE	Biologie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	H Aidara	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
10	Alou A.	KEITA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Bréhima	KOUMARE	Bactériologie-Virologie
14	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
15	Saibou	MAIGA	Législation

16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

➤ **DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

1. PROFESSEURS /DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
7	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
8	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
9	Ousmane	KOITA	Biologie Moléculaire
10	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCE/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/Bio-statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
6	Ousmane	TOURE	Santé Publique /Santé Environnement

3. MAITRES ASSISTANTS /CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAÏKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biochimie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
13	Ibrehima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Almoustapha Issiaka	MAIGA	Bactériologie-Virologie
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé publique/Santé communautaire
19	Oumar	SANGHO	Épidémiologie

4. ASSISTANTS /ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dite Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEÏTA	Santé publique /Santé Environ.
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

➤ DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Rokia	SANOOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAÎTRES DE CONFERENCES/MAÎTRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

3. MAÎTRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
6	Mahamane	H Aidara	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique

12	Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

➤ **DER: SCIENCES DU MEDICAMENT**

1. PROFESSEURS/ DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES /MAÎTRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

➤ **DER: SCIENCES FONDAMENTALES**

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

3. MAÎTRES ASSISTANTS /CHARCHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mahamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

➤ CHARGES DE COURS (VACCATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit Commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I.	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie Organique
8	Aboubakary	MAIGA	Chimie Organique
9	Massambou	SACKO †	SCMP/SIM
10	Modibo	SANGARE	Anglais

11	Satigui	SIDIBE	Pharmacie Vétérinaire
12	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
13	Fana	TANGARA	Maths
14	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et pathologie Médicale
15	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
16	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

DEDICACES

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. Louange à Allah seigneur de l'univers.

Je dédie cette thèse :

À mon père Feu Mafing KABA

Papa ce présent travail est le fruit de tes nombreux efforts fournis pour mon éducation et ma formation, je ne saurais trouver les mots adéquats pour t'exprimer ma profonde gratitude. Tes énormes sacrifices consentis pour ta famille, ton immense amour pour tes semblables et ton dévouement sont des qualités qui nous ont permis de te voir comme une référence et un modèle à suivre. Mon souhait était de passer ce grand jour de succès avec toi mais comme on le dit souvent nul ne peut rien contre la volonté de Dieu.

Repose en paix vieil homme sage, le seigneur veille sur toi.

Que le paradis soit ta dernière demeure Père Amine !

À ma mère Tidanke KABA

Mère ! tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence. Toi qui malgré tes multiples préoccupations a su faire de moi un être capable de faire du bien pour ses semblables. Diriger une famille dont le père est décédé n'est pas une chose facile mais ton courage et ta détermination t'ont permis de relever ce défi.

Je continuerai à suivre tes conseils à la lettre. Je te remercie infiniment pour tout le bien que tu as fait pour ton fils. Puisse Allah, le très haut, t'accorder une longue vie pleine de santé Amine !

À mes frères et sœurs : Mohamed Mafing, Sory Ibrahim, Saran, Sérégbè, Seydou, Mohamed Lamine, Nagnouma, Mohamoud, Laye Mamadi, Alpha Kabiné

Votre accompagnement et votre soutien du début jusqu'à la fin de mon parcours scolaire n'a jamais fait défaut. Les moments passés en votre compagnie sont les plus beaux souvenirs qui seront gardés dans ma mémoire pour le restant de mes jours. Je n'ai jamais douté que vous étiez là pour moi et j'espère qu'un jour j'aurai la chance de vous rendre la monnaie de votre pièce.

À tous et à chacun merci pour tout.

REMERCIEMENTS

Je rends grâce à Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux, qui nous a permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements les plus sincères :

À toute la famille KABA du Mali et de la Guinée

De près ou de loin, j'ai reçu des encouragements de la part de tout un chacun, soyez rassuré de ma sincère reconnaissance et j'espère être à la hauteur des attentes dans les jours à venir.

À Mme NANTOUME Fatoumata KASSOGUE, Mme SIDIBE Nakia TOURE, Mme YALCOUYE Wassa DIAKITE

Vos bénédictions, votre accompagnement et votre soutien au cours de mon parcours universitaire a été d'un grand soulagement. Puisse Allah vous garder longtemps auprès de nous. Amine !

À mes ami(e)s : Bilaly KEITA, Mamadou SIDIBE, Aboubacar TRAORE, Yaya Diarra, Mohamed NANTOUME, Laye DIAKITE, Youssouf COULIBALY, Bintou M'BAYE, Tamba KONE, Oumar YALCOUYE, Mameri DOUMBIA, Koli DEMBELE, Moussa KOITA, Lassine DIALLO, Bakaina DIARRA, Mahamadou TOGOLA, Hampata DICKO, Amadou BASSOUM, Gai Frank PETTE, Claire KONE

Vous avez toujours été là à chaque fois que le besoin s'est fait ressentir, vous rencontrez au cours de mon existence fut la plus belle chose qui puisse jamais m'arriver. Merci à vous d'être parmi les piliers de ma vie.

À tous les membres de la 11^{ème} promotion « Promotion Feu Pr Moussa HARAMA »

Être membre et président de cette promotion est le plus grand privilège que Dieu m'a offert au cours de mon parcours. Les années passées ensemble à la faculté furent denses, non seulement en apprentissage, mais aussi en émotions fortes. Je suis fier d'appartenir à cette promotion unie et solidaire. Je souhaite un avenir radieux et une bonne carrière professionnelle à tous.

À mes camarades de thèse : Ibrahim BAGAYOKO, Abdoulaye CAMARA, Youssouf DOUMBIA, Amadou DIALLO, Zaynab TOURE, Alpha DIALLO

Nous avons collaboré durant l'un des moments les plus cruciaux de nos vies. Je ne suis pas prêt d'oublier nos expériences et nos bons moments passés au laboratoire.

À Docteur Aliou Badara WADE

Merci à ce grand monsieur au sens élevé de considération qui me donne de jour en jour le vrai goût du métier de pharmacien. J'espère que votre leadership, votre coaching et vos conseils me permettront d'être un bon professionnel de la santé.

À tout le personnel de la Pharmacie WASSA DAOUDABOUGOU

Vous m'avez accueilli à bras ouverts et vous m'avez initié au métier du pharmacien d'officine. Merci pour votre professionnalisme et votre considération.

À tout le personnel du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA)

Merci pour votre disponibilité et votre accessibilité qui n'ont jamais fait défaut. Je me suis senti en véritable scientifique à vos côtés.

À l'équipe de l'unité de zoonose du LBMA : Docteur Lassina DOUMBIA, Docteur Mariam TRAORE et Mr Nanourou DEMBELE

Partager la paillasse de l'unité de zoonose du LBMA avec vous a été l'un des moments forts pour ce travail. Je vous remercie pour votre dynamisme et votre soutien.

A tout le personnel du laboratoire et du service de gynécologie du CSRéf Commune V

Votre participation à ce travail a été plus que capitale, vous nous avez permis d'avoir nos échantillons, que Dieu vous récompense pour ce bien fait.

À Docteur Modibo TELLY et à Docteur Satigui SIDIBE

Merci à vous chers docteurs pour vos soutiens indéfectibles à la réussite de ce document.

À l'Amicale des Étudiants en Pharmacie du Mali (AEP- Mali)

Cette amicale fut pour moi un cadre idéal d'apprentissage et d'échanges avec les autres camarades. Merci à tous pour ces moments partagés.

À mes aînés et cadets de la Faculté de Pharmacie

Merci pour votre disponibilité, votre accompagnement, votre estime et votre considération.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Souleymane DIALLO

- ✓ **Professeur honoraire de Bactériologie Virologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako ;**
- ✓ **Ancien directeur général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali ;**
- ✓ **Président du Comité National de Certification de l'Eradication de la Poliomyélite (CNC) pour le Mali ;**
- ✓ **Officier de l'Ordre National du Mali.**

Cher Maître,

C'est pour nous un grand honneur de vous avoir comme président du jury. Vous nous avez reçus avec beaucoup d'amabilité. Votre esprit d'ouverture et votre amour pour le travail bien fait vous procurent respect et considération. La qualité de vos enseignements fait de vous un Maître model.

Veillez accepter Cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et juge

Docteur Djeneba SY

- ✓ **PhD en Microbiologie ;**
- ✓ **Docteur en Médecine Vétérinaire ;**
- ✓ **Chargée de Recherche ;**
- ✓ **Co-gestionnaire administrative de l'unité de zoonose (LBMA) ;**
- ✓ **Mise en place de la plateforme Une Seule Santé au Mali sur financement de l'USAID à travers le projet sous régional Préparation et Réponse ;**
- ✓ **Chargée de la surveillance des maladies zoonotiques à potentiel épidémique au LBMA ;**
- ✓ **Contrepartie pays de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) pour le renforcement des capacités des laboratoires de références ;**
- ✓ **Membre du comité de crise pour la gestion de l'épidémie du nouveau coronavirus au Mali.**

Cher Maître,

Nous apprécions à sa juste valeur l'intérêt avec lequel vous avez accepté de juger cette thèse. Merci pour vos corrections et suggestions très utiles qui ont permis d'améliorer notre travail. Trouvez ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

A notre Maître et juge

Docteur Ousmane Sory SANOGO

- ✓ **Docteur en pharmacie ;**
- ✓ **Chef de service de l'unité laboratoire-pharmacie du Centre de Santé de Référence de la Commune V.**

Cher Maître,

C'est un privilège que vous nous accordez en acceptant de juger cette thèse, nous en sommes très honorés. Votre simplicité et votre gentillesse nous ont beaucoup marqué. Veuillez recevoir cher Maître, l'expression de notre profonde gratitude.

A notre Maître et juge**Docteur Soumana Oumar TRAORE**

- ✓ **Maître-Assistant en Gynécologie Obstétrique à la FMOS ;**
- ✓ **Gynécologue obstétricien au CSRéf de Commune V du district de Bamako ;**
- ✓ **Certifié formateur du programme GESTA international ;**
- ✓ **Animateur des activités d’audits de décès maternels au CSRéf Commune V ;**
- ✓ **Membre de la Société Malienne de Gynécologie et d’Obstétrique (SOMAGO).**

Cher Maître,

Permettez-nous de vous adresser nos remerciements les plus sincères.

Vous avez été au cœur de ce travail du début jusqu’à la fin.

Nous avons été très touchés par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de siéger à ce jury.

Retrouvez ici cher Maître nos sincères remerciements.

A notre Maître et Co-directeur de thèse

Docteur Lassina DOUMBIA

- ✓ **Docteur en Pharmacie ;**
- ✓ **Chef de l'unité de zoonose (LBMA) ;**
- ✓ **Membre de l'équipe de diagnostic du COVID-19 au LBMA.**

Cher Maître,

Nous ne saurons jamais trouver assez de mots pour témoigner notre reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Votre disponibilité et votre rigueur font de vous un Maître à admirer. Veuillez accepter cher Maître, le témoignage de notre profond respect et de notre sincère gratitude.

A notre Maître et Directeur de thèse**Professeur Ousmane KOITA**

- ✓ **PhD Tulane University ;**
- ✓ **Pharmacien Biologiste ;**
- ✓ **Professeur titulaire de biologie moléculaire a la FAPH ;**
- ✓ **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de la FST ;**
- ✓ **Membre du comité scientifique interdisciplinaire et partenarial COVID-19 de l'IRD France ;**
- ✓ **Président du comité scientifique et technique de l'INSP.**

Cher Maître,

Merci pour nous avoir accueilli dans votre service. Merci pour votre soutien, votre patience, vos encouragements et votre optimisme infaillible. Vous êtes une référence dans le domaine de la formation et de la recherche. Nous sommes fiers d'être comptés parmi vos élèves. Nous vous prions de trouver ici, cher Professeur, le témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre immense respect.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius

µl : Microlitre

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AIEA : Agence Internationale de l'Energie Atomique

al. : Associé

ARN : Acide Ribonucléique

ASACO : Association de Santé Communautaire

B. : *Brucella*

BCSP : Beta-Conglycinin Storage Protein

bp : Paire de Base

CN : Contrôle Negatif

CO₂ : Dioxyde de Carbone

COVID-19 : Coronavirus disease 2019 (Maladie à Coronavirus 2019)

CP : Contrôle Positif

CPN : Consultation Prénatale

CSRéf : Centre de Santé de Référence

CV : Commune V (Identifiant des échantillons)

dNTP : Désoxyribonucléoside Triphosphate

EDTA : Acide Ethylène-Diamino-Tétra acétique

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FAPH : Faculté de Pharmacie

FMOS : Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie

FST : Faculté des Sciences et techniques

g : Gramme

GAIA : Global Alliance To Immunize Against AIDS

H₂S : Sulfure d'hydrogène

IgA : Immunoglobuline A

IgE : Immunoglobuline E

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

INSP : Institut National de Santé Publique

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

IS711 : Sequence d'Insertion 711

kb : kilo base

kDa : Kilo Dalton

LBMA : Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

LCV : Laboratoire Central Vétérinaire

LPS : Lipopolysaccharide

mg : Milligramme

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

mM : Milli Molaire

MM : Marqueur Moléculaire

Na Cl : Chlorure de Sodium

NO₃ : Nitrate

OMP : Outer Membrane Proteins (Protéines de la membrane externe)

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PCR : Polymerase by Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

pH : Potentiel d'Hydrogène

PK : Protéinase K

rpm : rotation par minute

SDS : Sodium lauryl Sulfate

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

TBE : Tris Borate EDTA

TNF α : Tumor necrosis factor α (Facteur de Nécrose Tumorale) α

USAID : United States Agency for International Development (Agence des États-Unis pour le développement international)

UV : Ultra-Violet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : liste des amorces utilisées pour détecter le gène Omp2a de Brucella. [56].	25
Tableau II : Répartition des patientes selon la tranche d'âge.	28
Tableau III : Répartition des patientes selon la profession.	28
Tableau IV : Répartition des patientes par Commune.	29
Tableau V : Répartition des patientes selon les résultats sérologiques.	30
Tableau VI : Répartition des échantillons positifs au test de Rose Bengale selon la tranche d'âge.	30
Tableau VII : Répartition des échantillons positifs au test de Rose Bengale selon la profession.	31
Tableau VIII : Répartition des échantillons positifs au test de Rose Bengale par Commune.	31
Tableau IX : Répartition des échantillons en fonction de la détection du gène Omp2a de Brucella.	32
Tableau X : Répartition des échantillons positifs à la PCR selon la tranche d'âge.	32
Tableau XI : Répartition des échantillons positifs à la PCR selon la profession.	33
Tableau XII : Répartition des échantillons positifs à la PCR par Commune.	33
Tableau XIII : Test de performance de la PCR par rapport au test de Rose Bengale dans le diagnostic.	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Incidence mondiale de la brucellose humaine [30].	7
Figure 2 : Représentation du trafic intracellulaire de <i>Brucella</i> dans la cellule HeLa et dans le macrophage [40].....	9
Figure 3 : échantillon positif au test de Rose Bengale (Source LBMA, cette étude 2019).....	22
Figure 4 : gel d'agarose des échantillons positifs à <i>Brucella</i> spp. en utilisant les amorces <i>Omp2a</i> (Source LBMA, cette étude 2019).	26

TABLE DES MATIERES

Table des matières

1	INTRODUCTION	1
2	OBJECTIFS	3
2.1	Objectif général :	3
2.2	Objectifs spécifiques :	3
3	GENERALITES	4
3.1	Historique :	4
3.2	Définition :	4
3.3	Agent pathogène :	4
3.3.1	Taxonomie	4
3.3.2	Habitat	5
3.3.3	Caractères bactériologiques	5
3.4	Épidémiologie :	7
3.5	Mode de transmission :	8
3.5.1	Transmission par contact directe :	8
3.5.2	Transmission par voie digestive :	8
3.5.3	Transmission par voie respiratoire :	8
3.6	Aspects cliniques :	8
3.6.1	Pathogénie	8
3.6.2	Forme clinique	10
3.7	Diagnostic biologique	11
3.7.1	Prélèvements	11
3.7.2	Diagnostic bactériologique	11
3.7.3	Diagnostic immuno-sérologique	12
3.7.4	Les techniques moléculaires	13
3.8	Traitement	15
3.8.1	Traitement de la brucellose aiguë	15
3.8.2	Traitement de la brucellose subaiguë focalisée	15
3.8.3	Traitement de la brucellose chronique	15
3.8.4	Traitement de la brucellose chez les femmes enceintes et les enfants	16
3.8.5	Prophylaxie	16
4	MATERIEL ET METHODES	18

4.1	Cadre et lieu d'étude :	18
4.2	Type et période de l'étude :	19
4.3	Population de l'étude :	19
4.3.1	Critères d'inclusion :	19
4.3.2	Critères de non-inclusion :	19
4.4	Echantillonnage :	20
4.5	Considération éthique et déroulement de l'étude :	20
4.6	Technique au laboratoire :	21
4.6.1	Prélèvement au CSRéf Commune V	21
4.6.2	Procédure au LBMA	21
4.7	Collecte saisie et analyse des données :	27
5	RESULTATS	28
5.1	Résultats descriptifs	28
5.1.1	Résultats sociodémographiques	28
5.2	Résultats analytiques	30
5.2.1	Résultats des tests sérologiques	30
5.2.2	Résultats des tests moléculaires	32
6	DISCUSSION	35
7	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
7.1	Conclusion	38
7.2	Perspectives	38
8	RECOMMANDATIONS	39
9	REFERENCES	40
10	ANNEXE	XXVI

1 INTRODUCTION

La brucellose est une maladie infectieuse commune à l'homme et à certains animaux due à des bactéries du genre *Brucella* [1]. C'est une maladie avec d'importantes répercussions sur les conditions sanitaires et socio-économiques de la population. Bien qu'elle soit négligée, la brucellose fait partie des zoonoses les plus fréquentes au monde avec plus d'un demi-million de nouveaux cas humains signalés chaque année [2,3].

C'est une maladie cosmopolite avec une prédominance dans le bassin méditerranéen, l'Asie de l'ouest, le Moyen-Orient, l'Amérique du sud, l'Amérique centrale et l'Afrique noire [4].

La brucellose comme de nombreuses maladies peut avoir plusieurs conséquences sur la grossesse, généralement c'est pendant la phase aiguë septicémique de la maladie que les bactéries contaminent le placenta et provoquent des cas d'avortements en répétition, des accouchements prématurés ou des cas de morts fœtales intra-utérines [5]. Al-Tawfiq et *al.* au cours de l'année 2013 en Arabie Saoudite, ont estimé que l'incidence de la brucellose au cours de la grossesse varie de 1,3 à 12 % dans les zones endémiques selon les auteurs et les régions [6].

Dans le monde, quelques études ont révélé des prévalences et des conséquences de cette maladie chez les femmes enceintes. Une étude réalisée en Turquie de 2003 à 2008 par Kurdoglu et *al.* a donné une prévalence de 6,14 % dont 92,3 % consommaient des produits laitiers non pasteurisés [7]. Une autre étude réalisée par Elshamy et *al.* en Arabie Saoudite d'août 2005 à décembre 2007 a révélé une incidence de la brucellose de 12,2 % avec 27,27 % de cas d'avortements; 12,72 % de morts fœtales intra-utérines et 10,90 % d'accouchements prématurés [8].

Par ailleurs, plus récemment d'autres prévalences ont révélé. Une étude menée par Ali et *al.* au Pakistan en 2016 a donné une prévalence de 5,8 % chez les femmes enceintes [9] et en 2014 au Rwanda, Rujeni et *al.* ont obtenu 25 % de femmes enceintes positives à la brucellose dont 73,3 % avaient eu des cas d'avortements et 26,7 % des cas de morts fœtales intra-utérines [10].

Au Mali, une étude menée en 2018 par Traoré à Bamako a donné une prévalence sérologique de 3,6 % et à la PCR, 15,0 % de positif à *Brucella abortus* et 24,0 % à *Brucella spp.* La prévalence de la Brucellose chez les femmes par la PCR dans cette étude était de 37,3 % pour *Brucella spp.* et 38,1 pour *Brucella abortus* [11].

En dépit de nombreuses informations acquises sur la brucellose, elle constitue toujours une sérieuse menace pour la santé humaine du fait de l'absence de la pasteurisation de lait du contact étroit entre le réservoir animal et l'homme, de la manipulation et de la consommation des produits animales contaminés. Une meilleure connaissance de la brucellose est nécessaire surtout dans les pays n'ayant pas mis en place un programme de lutte efficace contre cette maladie [12]. Lors des consultations prénatales les maladies zoonotiques comme la toxoplasmose et la brucellose sont recherchées. Il n'y a pas de test diagnostique pour appuyer les arguments cliniques pour la présence d'une infection à *Brucella*.

Au cours de cette étude nous avons examiné la possibilité de tester avec la technique de PCR la présence du genre *Brucella* chez les femmes enceintes vues en consultation prénatale au niveau du CSRéf de la Commune V dans le district de Bamako. Ainsi nous avons comparé une technique sérologique telle que la technique de Rose Bengale avec une technique moléculaire comme la PCR en utilisant les gènes codants pour les protéines de la membrane externe [13,14].

2 OBJECTIFS

2.1 Objectif général :

Contribuer à un meilleur contrôle de la brucellose à travers le dépistage de la maladie chez les femmes enceintes dans la Commune V du district de Bamako.

2.2 Objectifs spécifiques :

- Estimer la séroprévalence de la brucellose chez les femmes enceintes dans la Commune V du district de Bamako ;
- Estimer la prévalence de l'infection à *Brucella spp.* par la PCR chez les femmes enceintes dans la Commune V du district de Bamako ;
- Déterminer la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives de la PCR par rapport à la technique sérologique de Rose Bengale dans le cadre du diagnostic de la brucellose.

3 GENERALITES

3.1 Historique :

Au XIX^e siècle, des médecins anglais installés sur l'île de Malte avaient qualifié la brucellose d'entité nosologique, et c'est en 1859, qu'une première description fiable fut attribuée par Allen Jeffrey Marston, ainsi David Bruce isola en 1886 l'agent en cause (initialement nommé *Micrococcus melitensis*) de cette maladie dans les rates de militaires décédés. En 1897, le test diagnostique par séroagglutination permettant la détection d'anticorps *Brucella* dans le sérum des malades fut décrit par Almroth Wright [15,16].

D'autres travaux ont été menés, notamment en 1895 par le vétérinaire Danois Bernard Bang, qui isola chez les bovins ayant fait des avortements en série, une nouvelle bactérie qu'il nomma *Bacillus abortus*. En 1917, Alice Evans, bactériologiste américain, établit une relation entre les deux (2) bactéries et propose la création du genre *Brucella* en l'honneur des travaux de David Bruce, d'où les espèces *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*. Au fil du temps, d'autres espèces ont été isolées, à savoir *Brucella suis* en 1914 par Traum à la suite d'avortements chez des truies ; *Brucella canis* reconnue par Carmichael en 1966 comme responsable d'avortements chez la chienne de race Beagle ; *Brucella ovis* chez des moutons en 1953 et *Brucella neotomae* chez des rats du désert au Etats Unis en 1957 [15,16].

La brucellose a reçu plusieurs dénominations historiques outre que la fièvre de Malte et mélitococcie qui sont : fièvre de Crimée, fièvre de Gibraltar, fièvre de Chypre, fièvre ondulante, fièvre napolitaine, fièvre méditerranéenne, fièvre sudoro-algique, Maladie de Bang, maladie de Traum, septicémie de Bruce etc... [15,16].

3.2 Définition :

La brucellose est une zoonose dont l'agent responsable est un coccobacille du genre *Brucella* vivant chez les animaux de façon naturelle et pouvant se transmettre à l'homme. Selon l'OMS, c'est une maladie à déclaration obligatoire, mais elle figure parmi les sept (7) maladies les plus négligées au monde [1].

3.3 Agent pathogène :

3.3.1 Taxonomie

Le genre *Brucella* appartient au groupe alpha *Proteobacteria* (sous-groupe) et à la famille des *Rhizobiaceae*. Sur le plan taxonomique, le genre *Brucella* comptait anciennement

six (6) espèces, (séparées en biovars selon leurs spécificités pour l'hôte) [17]. Conventionnellement avec l'ancienne classification, les noms des espèces se différencient en fonction des hôtes, par exemple, *Brucella maris* regroupe l'ensemble des souches identifiées chez les mammifères marins ; *Brucella cetaceae* (espèces isolées chez les dauphins) et *Brucella pinnepediae* regroupant toutes les espèces isolées chez les pinnipèdes (phoques, otaries et morses) [17].

Actuellement, nous avons une dizaine d'espèces appartenant au genre *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti* et *B. inopinata*. Quatre espèces parmi celles-ci sont incriminées dans les infections de l'homme, à savoir *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. canis* [1,18].

3.3.2 Habitat

Les *Brucella* se trouvent essentiellement chez les animaux qui jouent le rôle de réservoir ou d'hôte mais peuvent également se retrouver dans l'environnement et les produits alimentaires [19]. Elles sont pathogènes pour une grande variété de mammifères sauvages et domestiques, les espèces incriminées dans les infections sont différentes selon les animaux, par exemple *Brucella melitensis* infecte surtout les ovins et les caprins, *Brucella abortus* les bovins, *Brucella suis* les porcins [20]. Des souches de *Brucella* ont également été isolées chez d'autres espèces domestiques (par exemple les camélidés), chez des ruminants sauvages (par exemple le sanglier) et chez des mammifères marins (par exemple les dauphins) [21].

3.3.3 Caractères bactériologiques

❖ Caractères morphologiques et structuraux

L'agent pathogène de la brucellose est une bactérie du genre *Brucella* qui est un petit coccobacille à Gram négatif, mesurant de 0,5 à 1,5 µm de long et de 0,6 à 0,7 µm de diamètre. La bactérie est immobile, aérobic stricte, non sporulée sans capsule et avec un développement intracellulaire facultatif [22].

❖ Caractères biochimiques

Les *Brucella* sont aérobies strictes avec une positivité de la catalase, de l'oxydase, de NO₃, de l'uréase et une négativité des autres caractères métaboliques (hydrates de Carbone, protéines, acides aminées, acides nucléiques). Ce sont des germes non fermentaires mais oxydatifs [23].

La production d'H₂S varie en fonction des espèces et des biotypes. Le citrate n'est pas utilisé comme unique source de carbone. Il n'y a pas production d'indole. L'épreuve au rouge méthyl et les réactions de Voges–Proskauer sont négatives [23].

❖ Caractères cultureux

La culture des *Brucella* nécessite un délai de plusieurs jours, et souvent une atmosphère enrichie en CO₂ (5 à 10 %) avec une température de croissance optimale de 34-35°C et un pH de 6,6 à 7,4. Cette culture se fait sur des milieux enrichis tels que, la gélose Columbia au sang frais ou chocolat ; la gélose trypticase soja additionné de sérum. On peut également utiliser les milieux commerciaux actuels [23,24].

❖ Caractères antigéniques

L'antigène de surface est représenté par un lipopolysaccharide (antigène le plus immunogène) qui permet de classer les *Brucella* en deux types selon la présence ou l'absence de Chaîne O.

***Brucella* de type S "smooth ou lisse" (LPS-S)** : Présence des chaînes O caractéristique de *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*, dans lesquelles la plupart des antigènes de surface de *Brucella* sont présents. Les protéines de la membrane extérieure de *Brucella* ne peuvent pas être suffisamment exposées car la surface de la *Brucella* de type S est recouverte de LPS [25].

***Brucella* de type R "rough ou rugueux" (LPS-R)** : caractéristique des espèces *Brucella ovis* et *Brucella canis*, il y a une absence des chaînes en O [26]. Les protéines de la membrane extérieure peuvent être exposées à la surface des *Brucella* de type R [25].

Il existe des possibilités de réactions croisées entre l'antigène (LPS-S) et d'autres bactéries telles que *Yersinia enterocolitica* sérotype 0,9, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* et plus rarement avec *Escherichia coli* 0:157 ou certaines *Salmonella* notamment *Salmonella* serogroupe 0:30 [23,27].

❖ Résistance physico-chimique

Le genre *Brucella* est sensible à l'action de la chaleur, des rayons ultraviolets et de nombreux désinfectants comme : l'hypochlorite de sodium à 1 % (eau de javel), l'éthanol à 70 %, glutaraldéhyde, formaldéhyde etc... [28], mais elle résiste en dehors de l'hôte : dans les

carcasses et organes jusqu'à 135 jours ; dans le sang à 4°C pendant 180 jours ; dans les avortons pendant au moins 75 jours et dans les exsudats utérins pendant au moins 200 jours [29].

3.4 Épidémiologie :

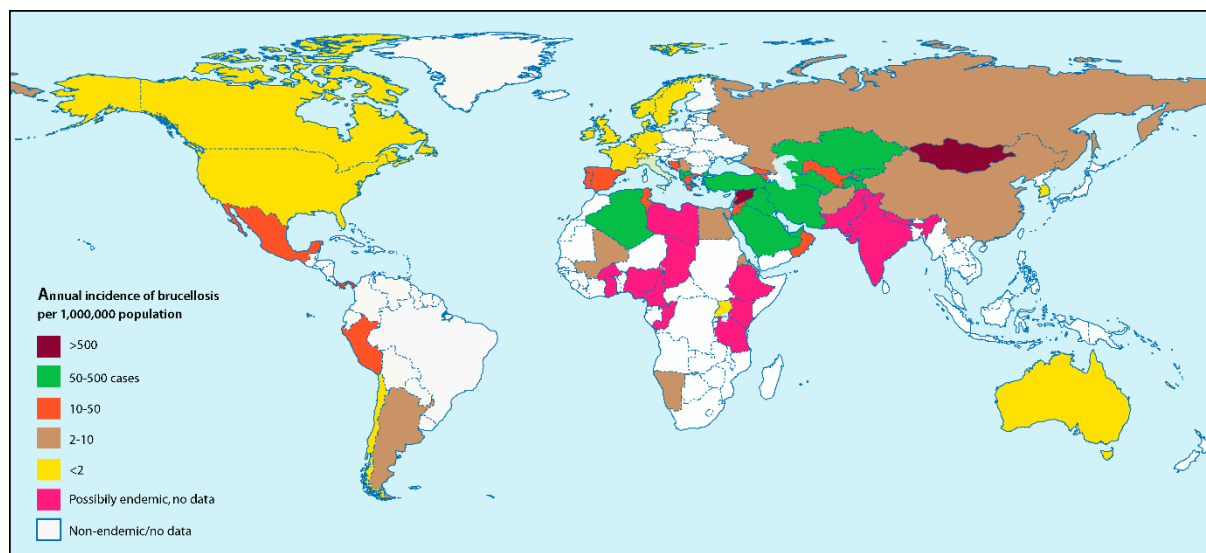


Figure 1: Incidence mondiale de la brucellose humaine [30].

La brucellose ou encore fièvre de Malte est une zoonose cosmopolite qui est à la fois une maladie humaine sévère qui retentit sur la santé publique et une maladie animale dont les conséquences socio-économiques sont loin d'être négligeables [31]. Sa répartition géographique est mondiale avec une multitude d'espèces touchées mais une forte concentration de la maladie est en corrélation avec les régions d'élevage. La densité des cas est surtout marquée en Afrique, en Asie, et dans certains pays du bassin méditerranéen, d'Amérique latine et d'Europe centrale [32].

L'incidence et la prévalence de la maladie diffèrent selon les pays, la maladie devient de plus en plus rare dans les pays ayant instauré une politique sévère de dépistage et d'éradication par la vaccination ou l'abattage, tandis qu'elle reste endémique dans les pays ne disposant pas des moyens pour mettre en place une politique de lutte massive contre celle-ci [32]

La brucellose humaine est en générale fonction de la maladie animale, car l'homme infecté n'excrète que très peu de *Brucella*, son incidence bien que difficile à évaluer est variable

allant de 0,125 à 200 cas pour 100 000 habitants selon les régions [33]. En règle générale l'homme s'infecte à partir des animaux infectés ou de produits provenant de ceux-ci [31].

B. melitensis et *B. abortus* sont les espèces le plus rencontrées en pathologie humaine, *B. melitensis* étant responsable des infections les plus graves [15].

3.5 Mode de transmission :

Il existe plusieurs moyens de transmission de la brucellose

3.5.1 Transmission par contact directe :

Elle se fait par contact cutanéomuqueux entre un animal infecté et un sujet sain et représente 75 % de cas [23,34].

3.5.2 Transmission par voie digestive :

Elle représente 25 % des cas et est due à la consommation de produits alimentaires contaminés [23,34].

3.5.3 Transmission par voie respiratoire :

Elle se réalise par inhalation d'aérosols et de poussières litières contaminés [23,34].

La transmission interhumaine demeure rare, mais elle n'est pas à exclure. Il est aussi important de retenir la notion de maladie professionnelle : le personnel de laboratoire lors de la manipulation, les éleveurs, les fermiers, les vétérinaires, et les travailleurs des abattoirs qui, sont professionnellement exposés à la maladie [34].

3.6 Aspects cliniques :

3.6.1 Pathogénie

Les *Brucella* sont des pathogènes intracellulaires facultatifs qui se multiplient principalement dans les cellules des macrophages monocytes. Cette multiplication peut continuer par l'inhibition de la fusion phagolysosomiale [22].

Les *Brucella* ne secrètent pas de toxines, elles créent un état d'hypersensibilité retardée à la suite d'une réaction de défense immunitaire à médiation cellulaire [35].

Les facteurs de pathogénicité chez l'homme ne semblent pas être totalement élucidés, les expériences sur les animaux de laboratoire notamment la souris ont permis de comprendre certaines caractéristiques de la maladie mais l'infection naturelle chez l'homme et les animaux semble être beaucoup plus différentes [35].

A la différence de l'infection causée par la plupart des bactéries comme *Escherichia coli* ou *Salmonella Typhi*, il n'y a pas de synthèse du $TNF\alpha$ par le macrophage humain infecté, ce qui explique en partie le mécanisme de résistance bactéricide du macrophage [36].

La virulence de la bactérie est fonction des espèces avec une prédominance chez l'homme de *Brucella melitensis*, *Brucella canis* et *Brucella abortus* [37], L'évolution de la pathologie peut dépendre de l'âge du patient, de son statut nutritionnel et surtout de son système immunitaire [38].

La production d'anticorps spécifiques joue un rôle dans la protection et l'immunité. Cependant, l'immunité à médiation cellulaire reste le principal mécanisme de défense contre la bactérie, et les anticorps protecteurs sont dirigés contre les LPS-S [39]. On retrouve une corrélation entre les IgE spécifiques et les manifestations cliniques, telles que les réactions d'hypersensibilité retardées observées chez les sujets ayant des contacts répétés avec *Brucella* [39].

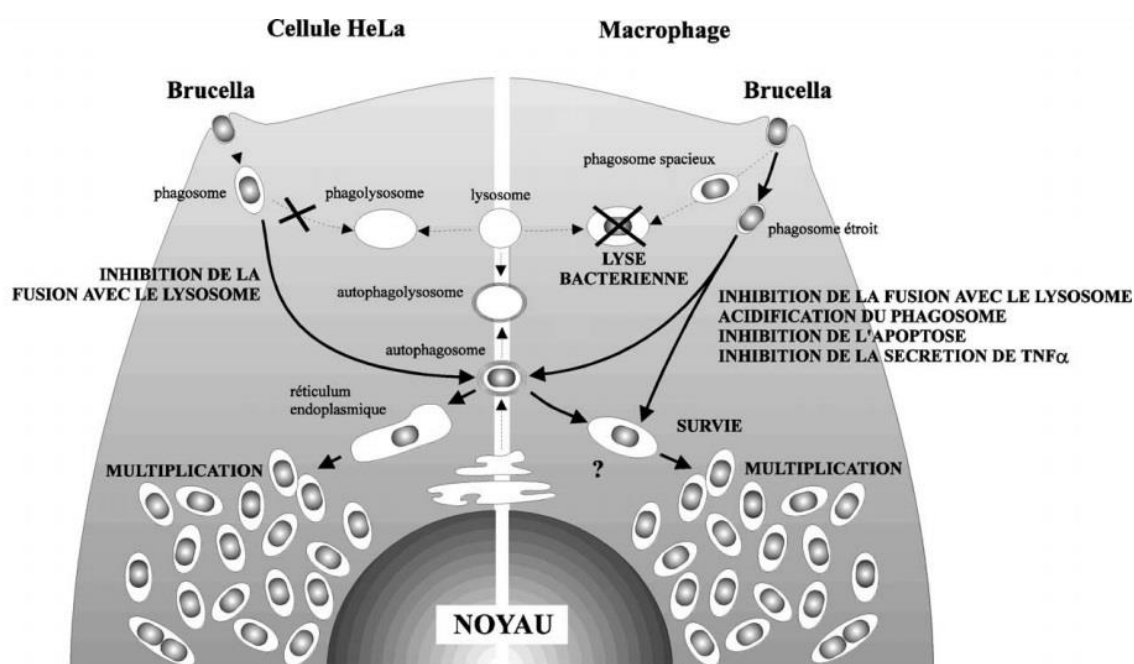


Figure 2 : Représentation du trafic intracellulaire de *Brucella* dans la cellule HeLa et dans le macrophage [40]

❖ Effet de la maladie sur la grossesse

Les *Brucella* entraînent une interruption des échanges nutritifs entre la mère et son fœtus provoquée par une placentite exsudative et nécrotique, par la suite, le fœtus meurt d'anoxie et

il y a avortement. L'ingestion de la bactérie par le fœtus provoquant une septicémie mortelle peut être aussi responsable de l'avortement [8]. On peut observer des cas de naissance prématurée lorsque l'expulsion du fœtus vivant est effectuée sous la dépendance de modifications hormonales, consécutives aux lésions placentaires et parfois, le nouveau-né souffre de lésions cérébrales d'origine hypoxique entraînant sa mort dans les 48 heures suivant sa naissance [41].

Dans tous les cas, le diagnostic précoce et le traitement de la brucellose pendant la grossesse peut sauver la vie du fœtus [8].

3.6.2 Forme clinique

Avec des manifestations cliniques classiquement protéiformes et une période d'incubation variable (1 à 3 semaines), la brucellose évolue en trois (3) stades :

❖ Brucellose aiguë septicémique

Le début de la maladie est insidieux et marqué par une asthénie et une fièvre ondulante qui s'accompagnent de sueurs et d'arthralgies, la brucellose dans sa phase aiguë se traduit par une septicémie d'origine lymphatique caractérisée par la colonisation du système réticulo-endothélial par les bactéries : tableau de la fièvre ondulante sudoro-algique [22,40]. Cependant, à ce stade, il y a un risque d'évolution de la maladie à une forme suppurée localisée.

❖ Brucellose subaiguë focalisée

Les brucelloses focalisées ont une localisation ostéo articulaire dans la majorité des cas, environ 75 % (arthrite, spondylodiscite, sacro-iléite). Elles peuvent souvent être aussi neuroméningées dans 10 % des cas ; et rarement hépatospléniques ; cardiaques ou génitales. L'apparition de foyers secondaires métastatiques dans ces formes focalisées tels que les endocardites et les nombreuses rechutes de la maladie même après un traitement antibiotique, s'expliquent par la survie de la bactérie à l'intérieur des cellules [23,40].

❖ Brucellose chronique

Ce stade se définit par une évolution prolongée de la maladie. Elle est parfois subjective marquée par un état général conservé avec une asthénie physique, psychique et parfois sexuelle. Elle peut être due à la persistance d'antigènes de *Brucella* et à l'absence de traitement antibiotique [23,40].

3.7 Diagnostic biologique

3.7.1 Prélèvements

Le diagnostic biologique de la brucellose consiste essentiellement à :

La mise en évidence de la bactérie dans les prélèvements d'échantillons biologiques (sang, liquide de ponction, moelle osseuse etc.)

Dosage des anticorps spécifiques dans le sérum ou dans le LCR.

L'utilisation des tests cutanés ou d'autres tests in vitro dans l'étude de l'immunité à médiation cellulaire.

3.7.2 Diagnostic bactériologique

❖ Examens microscopiques

Les méthodes de coloration sont encore utilisées même si cette technique n'est pas assez spécifique [42].

La coloration de Gram sur les frottis d'autres prélèvements que le sang montre des coccobacilles à Gram négatif isolés ou en paires, mais à cause du fait qu'il est difficile de colorer *Brucella* avec la fuchsine, il faut dépasser le temps de coloration habituelle (30 secondes) et aller d'une à trois minutes [23]. Par contre, avec la technique de coloration Stamp, d'autres espèces de bactéries qui provoquent également des avortements chez les animaux, telles que *Chlamydophila abortus* ou *Coxiella burnetii*, apparaissent colorées en rouge, tout comme les *Brucella* [42].

Quant à l'utilisation d'une technique de l'immunofluorescence directe avec un anticorps spécifique marqué, elle s'avère nécessaire lorsqu'il n'y a pas la possibilité de faire une culture dans un échantillon à cause d'une grande contamination par d'autres bactéries ou d'une faible vitalité du germe [23].

❖ Mise en culture

C'est la technique de certitude dans le diagnostic de la brucellose. Elle consiste à isoler l'espèce de la bactérie à partir du sang, par hémoculture et plus rarement à partir d'autres prélèvements.

Ces cultures sont le plus souvent réalisées par la technique de Castaneda, qui nécessite l'utilisation d'un milieu biphasique composé d'une phase solide et d'une phase liquide dans le

même flacon d'hémoculture [24]. Après l'inoculation, l'air dans la bouteille est remplacé par un mélange d'air avec 10 % de CO₂ ajouté et incliné de sorte que le liquide coule sur le milieu solide, puis la bouteille est incubée en position verticale et examinée tous les 3 jours (cette étape peut être répétée pendant au moins 35 jours s'il n'y a pas d'apparition de colonies) [43].

La sensibilité des types de prélèvements dépend du stade de l'infection, l'hémoculture est moins sensible dans les cas de brucellose chronique et focalisée ou après une antibiothérapie, par contre la sensibilité des prélèvements à partir de la moelle osseuse ne diminue que lorsqu'il s'agit d'une brucellose chronique [15]. L'utilisation de milieux sélectifs est nécessaire pour l'isolement de *Brucella* à partir d'échantillons polymicrobiens. L'isolement dans les systèmes d'hémoculture automatisés est plus rapide [23].

- **Identification**

Le genre *Brucella* est généralement identifié par sa morphologie, sa coloration et ses principaux caractères (catalase, oxydase et uréase), par contre l'identification des espèces est plus délicate faisant appel à l'étude de l'action bactériostatique de la thionine et de la fuschine, à la sensibilité aux bactériophages, à la recherche de la production de H₂S. Quant à la détermination précise du biotype, elle nécessite des épreuves supplémentaires, notamment l'étude de l'oxydation des glucides et des acides aminés par une méthode manométrique [13].

3.7.3 Diagnostic immuno-sérologique

- ❖ **Diagnostic sérologique**

Les méthodes sérologiques sont importantes et indispensables dans le diagnostic de la brucellose, car les aspects cliniques peuvent être facilement assimilés à ceux d'une autre maladie et les différentes techniques sérologiques utilisées ne mettent pas en évidence les mêmes classes d'immunoglobulines permettant ainsi de suivre l'évolution de la maladie, de plus l'identification de *Brucella* dans les hémocultures ou d'autres prélèvements nécessite plus de temps et a une sensibilité en relation avec le stade de la maladie. La fiabilité des méthodes sérologiques dépend de la nature du test et de la préparation de l'antigène qui est généralement constituée d'une suspension de *Brucella* inactivé ou d'extraits plus ou moins purifiés [23,42].

- **Réactions d'agglutination**

La séroagglutination de Wright (SAW) est la première technique sérologique décrite et est actuellement la seule méthode parfaitement étalonnée (par le laboratoire international

FAO/OMS) sur le plan international. Elle demeure alors la technique de référence selon l'OMS. Il s'agit d'une technique d'agglutination en tube, facile à exécuter qui exige cependant un certain nombre de précautions pour éviter les erreurs telles que les phénomènes de zone (pro zone) ou la présence d'anticorps bloquants (IgG, IgA) qui induisent des réactions faussement négatives. Les phénomènes de zone sont détectés par l'évaluation de différentes dilutions du sérum test et la présence d'anticorps bloquants par l'absence d'agglutination après mélange d'un sérum positif contrôle au sérum [15,23].

L'épreuve de l'antigène tamponné (EAT) ou test de Rose Bengale est un test d'agglutination réalisé sur une lame ou sur carte à usage unique en milieu acide utilisant une suspension de *Brucella* inactivé colorée par le Rose Bengale. C'est une réaction simple, rapide ne présentant pas la présence du phénomène de zone et qui est souvent utilisée comme le test de dépistage de la brucellose humaine. Par contre, certaines directives actuelles de l'OMS recommandent une confirmation des résultats de ce test par d'autres tests [13,23].

- **Immunofluorescence indirecte**

C'est une méthode qui utilise également une suspension inactivée de *Brucella* avec une grande sensibilité même dans la phase chronique de la maladie, elle permet de faire un titrage des Ig totales ou des IgM [23].

- ❖ **Méthode immuno-enzymatique (ELISA)**

C'est une technique prometteuse dans le diagnostic de la brucellose qui reste longtemps positive et qui permet le diagnostic de la maladie en phase subaiguë ou en phase chronique. Elle est très sensible, très spécifique et est souvent utilisée dans les enquêtes épidémiologiques grâce à son automatisation facile. Toutefois, l'utilisation d'une grande variété d'antigènes rend difficile sa standardisation et sa commercialisation [15].

3.7.4 Les techniques moléculaires

Les méthodes moléculaires sont des outils précieux pour le diagnostic clinique et la surveillance de la santé publique, ainsi que pour l'identification des espèces et des sous-espèces [44].

Pour le diagnostic de la brucellose humaine, plusieurs méthodes basées sur la PCR ont été développées. Ces techniques ont été développées à l'origine sur des isolats bactériens et sont maintenant utilisées pour détecter *Brucella spp.* à partir de l'ADN dans des échantillons

cliniques. Il faut évaluer les méthodes d'extraction de l'ADN connues pour influencer sur la sensibilité des analyses PCR. Il convient de noter que la plupart de ces techniques ont été validées sur des échantillons humains, mais certains rapports évaluent leur application aux échantillons cliniques vétérinaires [42].

Les paires d'amorces généralement utilisées dans ces techniques pour la détection de *Brucella* comprennent les amorces pour les séquences codant pour l'ARNr 16S, la protéine de la membrane externe (*Omp2a*, *Omp2b*, *Omp25* et *Omp31*), la protéine immunogène *Brucella abortus* de 31 kDa (BCSP 31), la région interspace de l'ADN ribosomique 16S-23S et la séquence d'insertion (IS711) [45].

Les techniques de PCR permettant un diagnostic plus précoce et plus spécifique que la mise en culture sont particulièrement utiles après une antibiothérapie empêchant l'isolement de la bactérie et au cours d'un premier épisode d'infection ou d'une rechute [15,45,46]. Elles peuvent également permettre de différencier les espèces de *Brucella* et/ou leurs biovars, mais il existe souvent des faux résultats par la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les échantillons et/ou par une contamination. [15,46].

❖ Les principales protéines de la membrane externe de *Brucella* (OMP)

La membrane cellulaire de *Brucella* est composée de trois (3) couches : la membrane cytoplasmique, la membrane cytoplasmique périphérique, et la membrane externe. La membrane externe se lie étroitement à la couche de peptidoglycane pour constituer la paroi cellulaire contenant les lipopolysaccharides, les protéines et la couche de phospholipides [47].

Les principales protéines de cette membrane externe sont caractérisées comme des antigènes immunogènes et protecteurs potentiels. Elles sont classées en fonction de leur masse moléculaire en OMP 36-38 kDa ou protéines de porine du groupe 2 et OMP 31-34 et 25-27 kDa ou protéines du groupe 3 [48]. Les gènes *Omp2a* et *Omp2b* qui sont étroitement liés dans le génome de *Brucella*, partagent un grand degré d'identité (> 85 %) et codent pour les protéines de porine du groupe 2. Deux autres gènes *Omp25* et *Omp31* partageant 34 % d'identité, codent pour les protéines du groupe 3 [14].

Les OMP de *Brucella* sont impliquées dans la virulence (c'est-à-dire la résistance aux peptides cationiques bactéricides et aux polycations), dans la perméabilité aux agents hydrophobes, dans la résistance aux cations divalents chélateurs et dans la mauvaise activation

des mécanismes bactéricides par le LPS (Tibor et al., 2002) [25]. Des études au niveau moléculaire ont mis en évidence les mécanismes impliquant les OMP dans la pathogénèse et la virulence de *Brucella* [14].

3.8 Traitement

Le traitement de la brucellose dépend en partie du stade de la maladie et il faut une association d'au minimum deux (2) antibiotiques. Ce traitement a pour but de :

- Abréger la durée des symptômes ;
- Prévenir le risque de récurrences ;
- Éviter les complications.

3.8.1 Traitement de la brucellose aiguë

Les associations le plus souvent utilisées dans les cas de brucellose aiguë sont [49] :

- Doxycycline 200 mg/jour administré par voie orale pendant 6 semaines + Streptomycine 1g/jour en injection intramusculaire pendant 2 à 3 semaines
- Doxycycline 200 mg/jour + Rifampicine 600 à 900 mg/jour administré par voie orale pendant 6 semaines ou Rifampicine 900 mg/jour + Fluoroquinolone (Ofloxacin, Ciprofloxacine) 400 mg/jour administré par voie orale pendant 6 semaines.

Quel qu'en soit le schéma thérapeutique prescrit, la durée du traitement est de 6 semaines au minimum [49].

3.8.2 Traitement de la brucellose subaiguë focalisée

Nous avons le même schéma thérapeutique que les formes non focalisées mais sur une période plus longue d'au minimum 3 mois, une trithérapie (Doxycycline + Rifampicine + Aminoglycoside) est envisageable selon la symptomatologie [15,50].

3.8.3 Traitement de la brucellose chronique

Très généralement ce traitement ne nécessite pas l'administration d'antibiotique, il faut une thérapie symptomatique.

En cas de brucellose chronique allergique le seul traitement efficace à envisager serait l'antigénotherapie, qui consiste en une désensibilisation par injection de doses progressives (0,1mg/l jusqu'à 100mg/l) de mélitine ou de la fraction phénol-insoluble [23,50].

3.8.4 Traitement de la brucellose chez les femmes enceintes et les enfants

Des cas spécifiques peuvent se présenter notamment le traitement chez l'enfant de moins de 8 ans et la femme enceinte et plusieurs alternatives sont préconisées [5] :

- Cotrimoxazole + Rifampicine chez la femme enceinte administré par voie orale (compte tenu de la contre-indication des tétracyclines, des aminosides et des fluoroquinolones en cas de grossesse).
- Cotrimoxazole (80 mg de triméthoprim/kg par jour × 2 fois/jour) pendant 45 jours + Streptomycine (30 mg/kg par jour, IM en 1 fois/j) pendant 21 jours ou Gentamicine (5 mg/kg/jour, IM en 1 fois/jour) pendant 7 jours ou encore Rifampicine (15 mg/kg/jour) associée au Cotrimoxazole ou à la Streptomycine (compte tenu de la contre-indication des tétracyclines chez les enfants de moins de 8 ans à cause du risque de coloration permanente des dents).

Les complications issues de la brucellose peuvent souvent nécessiter un traitement chirurgical du foyer infectieux associé à un traitement médical : remplacement valvulaire en cas d'endocardite, ou cure chirurgicale d'une localisation vertébrale en cas de déficit neurologique [33].

3.8.5 Prophylaxie

Le meilleur moyen de prévention de la brucellose humaine repose sur le contrôle de l'infection chez les animaux. Ce contrôle est à la fois médical basé sur la vaccination des animaux et sanitaire basé sur le dépistage et l'abattage des animaux infectés. Il existe d'autres mesures de prévention qui consistent au respect des bonnes pratiques hygiéniques et alimentaires qui sont [51] :

- Le traitement thermique de certaines denrées alimentaires ;
- Le Port du gant chez les personnes exposées professionnellement ;
- Le Lavage des mains.

La prophylaxie lors d'une exposition accidentelle est variable selon le profil du patient :

❖ Chez les éleveurs, les vétérinaires ou les professionnels de laboratoire

Il faut préconiser l'administration d'une association de Doxycycline (200mg/jour) et de Rifampicine (600mg/jour) pendant au moins trois (3) semaines [52].

❖ **Chez les femmes enceintes**

Il faut l'administration du Cotrimoxazole (160/800 mg × 2 fois/jour de triméthoprimé–sulfaméthoxazole) pendant trois (3) semaines [5,15].

Dans tous les cas, un suivi sérologique est recommandé pendant une période minimum de trois (3) mois [15].

Toutes les tentatives de vaccination ont été soit inefficaces, soit dangereuses lorsqu'elles utilisaient les souches vaccinales animales [23].

4 MATERIEL ET METHODES

4.1 Cadre et lieu d'étude :

L'étude s'est déroulée en Commune V du district de Bamako au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et les échantillons ont été collectés au Centre de Santé de Référence de la Commune V.

❖ Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) [53]

Situé sur la colline de Badalabougou, c'est une structure de recherche publique à caractère académique affiliée à la Faculté des Sciences et Techniques, à la Faculté de Pharmacie et à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie. Il comprend plusieurs unités : parasitologie, virologie, biotechnologie animale et végétale, biologie clinique, zoonoses, entomologie et génomique.

C'est une structure de pointe dont les principales missions sont de :

- Promouvoir les recherches et la lutte contre le Paludisme et le VIH-SIDA à partir des outils de la biologie moléculaire ;
- Promouvoir les recherches et l'application de la biotechnologie dans le domaine des productions végétales et animales ;
- Contribuer à la modernisation de la formation universitaire à travers la biologie moléculaire ;
- Contribuer à la surveillance des maladies zoonotiques.

Le LBMA doté de grandes capacités, intervient dans plusieurs domaines et mène des activités de recherche en synergie avec plusieurs autres structures notamment, avec Tulane University pour le développement de médicament antipaludique, avec le Laboratoire Central Vétérinaire pour le contrôle de nouveau foyer de Glossines et la surveillance des maladies zoonotiques et avec le GAIA (Global Alliance To Immunize Against AIDS) pour le développement d'un vaccin contre le VIH, avec l'université Colorado USA et l'université Aix-Marseille France (Unité des virus émergents).

❖ Centre de Santé de Référence de la Commune V (CSRéf CV) [54]

Ce centre fut créé en 1982, dans le cadre de la politique de décentralisation du gouvernement malien en matière de santé avec un plateau minimal pour assurer les activités courantes.

Il est situé à la rive droite du fleuve Niger, dans la Commune V du District de Bamako et a pour mission :

- La prise en charge des cas référés ou évacués ;
- L'appui à la mise en place des structures communautaires ;
- La supervision et le monitoring des structures communautaires ;
- La surveillance épidémiologique ;
- Le suivi de l'application de la politique nationale en matière de Santé ;
- La formation des membres des ASACO, des structures communautaires et leur personnel technique ;
- La coordination et le suivi de toutes les activités sanitaires des structures communautaires ;
- L'élaboration du cadre conceptuel du système de référence/évacuation et la mise en place de la caisse de solidarité ;
- La mission d'études et de recherches.

4.2 Type et période de l'étude :

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive, prospective qui s'est déroulée de mai à décembre 2019.

4.3 Population de l'étude :

Les femmes enceintes venues au centre pour la consultation prénatale (CPN) constituaient la population de cette étude.

4.3.1 Critères d'inclusion :

Ont été incluses dans l'étude, les femmes enceintes venues au centre pour la CPN durant la période de collecte des échantillons et qui ont accepté de participer à l'étude.

4.3.2 Critères de non-inclusion :

N'ont pas été incluses dans l'étude, les femmes enceintes venues au centre pour la CPN durant la période de collecte des échantillons et n'ayant pas acceptées de participer à l'étude.

4.4 Echantillonnage :

La taille de l'échantillon a été calculée à partir de la formule de Schwartz [55].

$$N = Z^2 \times \frac{PQ}{i^2}$$

N = taille nécessaire de l'échantillon.

Z = Écart réduit de la loi normale, égale à 1,96 pour un intervalle de confiance = 5 %.

P = fréquence relative de la brucellose connue dans la population de femmes à Bamako.

Q = le complément de la probabilité de P ; q = 1- p, p = 1- q.

i = la précision souhaitée.

Au cours d'une étude réalisée au LBMA en 2019, la prévalence moléculaire de la brucellose chez les femmes était de 37 % [11].

$$N = Z^2 \times \frac{PQ}{i^2}$$

Ici : Z = 1,96 ; P = 0,37 ; Q = 0,63 ; i = 5 %

$$N = [(1,96)^2 \times 0,37 \times 0,63] / (0,05)^2 = 358,19$$

La taille nécessaire pour notre échantillon sera estimée à 358 cas plus 2,5 % d'erreur, qui nous donne un total estimé à 368 échantillons.

4.5 Considération éthique et déroulement de l'étude :

Une présentation sur la brucellose a été effectuée en mettant l'accent sur les femmes enceintes dans le service de gynécologie au CSRéf de la Commune V avant le début de l'échantillonnage afin de donner le maximum d'informations sur cette maladie.

Ainsi l'accord des responsables du CSRéf a été obtenu et le consentement verbal des patientes était obtenu au niveau du service de gynécologie avant de les envoyer au laboratoire du CSRéf pour le prélèvement.

Le respect strict de l'anonymat et la confidentialité des patientes conformément aux règles de la déontologie et de l'éthique ont été partie intégrante de l'étude.

4.6 Technique au laboratoire :

4.6.1 Prélèvement au CSRéf Commune V

Les prélèvements veineux étaient effectués dans les tubes contenant de l'EDTA et les tubes sans anticoagulants (tube sec) au laboratoire du CSRéf selon la procédure suivante :

- Hygiène des mains, friction hydro-alcoolique des mains et port des gants ;
- Identifier le patient et l'installer ;
- Choisir le bon côté et positionner l'avant- bras ;
- Rechercher et localiser une veine de bonne taille ;
- Poser le garrot environ 5 largeurs de doigts au-dessus du site de ponction ;
- Mémoriser les repères servant à retrouver le point de ponction ;
- Imbiber d'antiseptique les tampons et demander au patient de fermer le poing ;
- Désinfecter le site de ponction ;
- Préparer le matériel de ponction veineuse selon les indications du fabricant ;
- Immobiliser la veine ;
- Ponctionner la veine, prélever le sang et retirer le(s) tube(s) ;
- Desserrer le garrot, placer une compresse et retirer l'aiguille ;
- Homogénéiser les tubes par 3 retournements ;
- Eliminer directement l'aiguille dans la boîte de sécurité ;
- Appliquer un pansement sec ;
- Oter les gants et réaliser la friction alcoolique des mains.

4.6.2 Procédure au LBMA

Les échantillons prélevés sur tube EDTA et tube sec au CSRéf étaient transportés à 4°C au LBMA pour le test sérologique, l'extraction d'ADN et la PCR.

Une fois les échantillons arrivés au LBMA, on procédait à une centrifugation à 5000 g (accélération de la pesanteur, force centrifuge) par minute pendant 5 minutes à 25 °C afin de séparer le surnageant qui était utilisé pour le test de Rose Bengale et le culot globulaire du tube EDTA qui était utilisé pour l'extraction de l'ADN.

❖ Réalisation du test sérologique de Rose Bengale

Le test de Rose Bengale est un test rapide pour la détection d'anticorps anti-Brucella dans le sérum ou le plasma humain.

➤ **Principe**

La méthode se réalise sur une carte fournie par le fabricant. Le pH acide de la suspension empêche l'agglutination non spécifique des bactéries. Des anticorps agglutinants de type IgG, IgM et IgA interviennent dans la réaction.

➤ **Procédure**

Elle a été faite selon les instructions du fabricant.

1. Laisser les réactifs et les échantillons à la température ambiante.
2. Homogénéiser la suspension antigénique en l'agitant doucement.
3. Déposer 30 µl de l'échantillon à analyser dans un des cercles individuels de la carte et 30 µl du contrôle positif dans l'autre cercle de la carte.
4. Ajouter dans chaque cercle 30 µl de la suspension antigénique colorée au Rose Bengale.
5. Mélanger les deux gouttes à l'aide d'un bâtonnet d'homogénéisation de manière à recouvrir toute la surface du cercle.
6. Agiter la carte manuellement ou à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 4 minutes.

Observer la présence ou l'absence d'agglutination.

➤ **Interprétation**

La présence d'une agglutination révèle une réaction positive et indique l'existence d'anticorps dirigés contre *Brucella*. L'absence d'agglutination révèle une réaction négative et indique l'absence d'anticorps agglutinants dirigés contre *Brucella*.

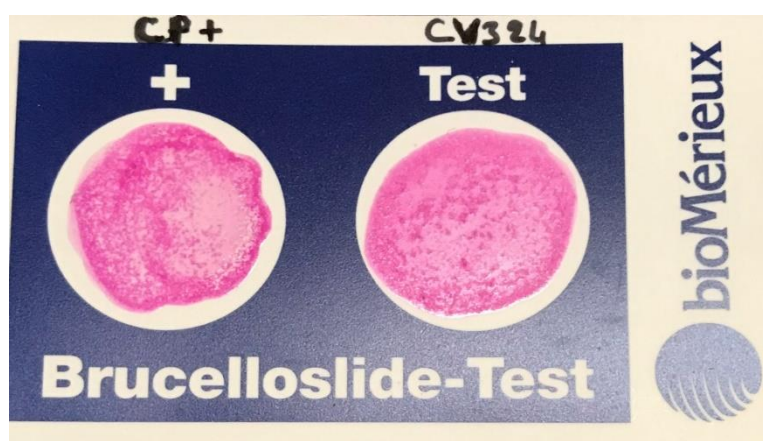


Figure 3 : échantillon positif au test de Rose Bengale (Source LBMA, cette étude 2019).

❖ Réalisation du test moléculaire

➤ Extraction de l'ADN

Nous avons procédé à l'extraction de l'ADN par la méthode Salting out

• Principe de la méthode Salting out

Il s'agit d'une déshydratation suivie de deux (2) précipitations, une première précipitation est celle des protéines par une solution de chlorure de sodium saturée et la seconde est celle de l'ADN par une solution d'éthanol absolu puis une élution de l'ADN par l'eau ultra pure.

• Protocole de la méthode Salting out

1. Mettre 1 ml de la solution de lyse et 500 µl de l'échantillon dans un tube. Passer au vortex (20 secondes) et centrifuger à 13000 rpm pendant 1 minute puis jeter le surnageant ;
2. Ajouter 1 ml d'eau distillée stérile, passer au vortex (15 secondes) et centrifuger à 13000 rpm pendant 1 minute, jeter le surnageant ;
3. Ajouter 370 µl du mix (80 µl de Buffer PK 5 X, 30 µl du PK, 20 µl de SDS 20 % et 240 µl d'eau distillée stérile) dans le tube et passer au vortex (15 secondes) puis incubé à 55 °C pendant 15 minutes ;
4. Ajouter 200 µl de NaCl 5 M, passer au vortex (15 secondes) et centrifuger à 13000 rpm pendant 5 minutes ;
5. Mettre 500 µl du surnageant dans un nouveau tube, ajouter 1 ml d'éthanol absolu, agiter délicatement à la main, centrifuger à 13000 rpm pendant 1 minute, jeter le surnageant ;
6. Ajouter 800 µl d'éthanol frais à 70 %, passer au vortex (15 secondes) et centrifuger à 13000 rpm pendant 1 minute. Jeter le surnageant (faire 2 fois cette étape). Egoutter les tubes sur du papier absorbant, puis incubé à boucher ouvert pendant au moins 2 heures ;
7. Ajouter 50 à 100 µl de TE (Tampon d'Elution) ou d'eau ultra pure, passer au vortex (5 secondes) et incubé pendant 2 minutes.

NB : Si l'ADN n'est pas utilisé immédiatement le conserver à -20 °C.

➤ Quantification de l'ADN

La quantification de l'ADN a été effectuée par spectrophotométrie.

• Principe

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative et qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les

limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert. La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.

- **Procédure**

Choisir la cuve correspondante avant d'allumer le spectrophotomètre. Ensuite préciser le paramètre à mesurer en appuyant sur le bouton correspondant au numéro du paramètre (ADN, ARN, Protéines...), puis entrer le facteur de dilution. Ensuite nettoyer la cuve avec de l'eau distillée avant de faire la mesure à blanc c'est-à-dire, dosé la densité de l'eau pour s'assurer du blanc de l'appareil. Si le blanc est correct passer à la mesure de l'échantillon. Enfin diluer l'échantillon avec de l'eau distillée dans la cuve avant de la placer dans l'appareil et mesurer en appuyant sur le bouton **échantillon** et noter le résultat (la concentration en ADN, le rapport de pureté).

- **Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)**

Les gènes *Omp2a* de *Brucella* : Les séquences spécifiques de ce gène ont été utilisées pour l'identification moléculaire de la brucellose.

Omp2a est un gène qui code pour les protéines de porine du groupe 2. Ces protéines font parties d'une classe des OMP qui présentent une forte antigénicité et peuvent être utilisées pour le diagnostic moléculaire de la brucellose.

- **Procédure**

Préparation du mélange réactionnel

Préparation d'un mélange mixte de volume total de 25 μ l avec 1X de Buffer, 3 mM de $MgCl_2$, 0,4 mM des di-nucléotides triphosphate (dNTPs), 0,4 μ M de chaque amorce (tableau 1) codant pour *Omp2a* et 0,8 U de *Taq polymérase* (BioLabs et Promega).

dNTPs : il s'agit de dGTP dCTP dATP dTTP.

Pour chaque réaction nous avons utilisé l'ADN extrait à partir de l'antigène de *Brucella abortus* 99 du kit **Rose Bengale** de Bio Mériex comme contrôle positif et l'eau ultra pure comme contrôle négatif.

Nom	Orientation	Séquence d'amorce 5' – 3'	Taille d'amplicon	Référence
<i>Omp2a</i>	Forward	5'-GTGGCGATCTTGTCCG-3'	1100 bp	CloECKaert A et al 1995
	Reverse	5'-ACGGCGATGGATTCCG-3'		

Tableau I : liste des amorces utilisées pour détecter le gène *Omp2a* de *Brucella*. [56].

Programme de la PCR

Le programme d'amplification a été réalisé à l'aide du thermocycleur (PTC-200 de MJ Research, Inc., USA), et comprenait une dénaturation initiale des brins d'ADN à 94 °C pendant 5 minutes suivie d'un cycle incluant une dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, une hybridation à 57,2 °C pendant 2 minutes et une extension de la copie du brin d'ADN à 72 °C pendant 3 minutes (répétition de ce cycle 34 fois), enfin une extension finale à 72 °C pendant 10 minutes. Les produits d'amplification sont conservés dans le thermocycleur à 4 °C jusqu'à la récupération des amplicons pour la migration.

- **Electrophorèse du produit d'amplification**

Cette technique a lieu sur du gel agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium.

- **Principe de l'électrophorèse**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est communément utilisée pour séparer les molécules en fonction de leur charge (poids), leur taille et leur forme. Il s'agit d'un moyen de séparation particulièrement efficace pour les biomolécules chargées telles que l'ADN, l'ARN et les protéines.

- **Procédure de l'électrophorèse**

Il faut d'abord préparer un gel d'agarose à 1 % avec une solution de TBE 0,5 X au four à micro-ondes pendant 1 minute, 20 secondes et ajouter 0,3 % de bromure d'éthidium, mélanger puis couler dans un bac monté d'un peigne sur une surface plane bien ajustée. Laisser le gel se polymériser pendant environ 30 minutes, puis retirer les peignes. Avant de loger, déposer 2 µl de Dye sur du papier parafilm pour chaque échantillon.

Mettre 3 µl du marqueur 1 kb dans le premier puits, les échantillons et les contrôles dans les autres puits. Mélanger 8 à 10 µl de l'échantillon avec 2 µl de Dye et déposer successivement dans les puits réservés à cet effet. Puis faire migrer du pôle moins (-) vers le pôle (+) pendant 1 heure à 120 Volt.

- **Visualisation et Interprétation**

Après la migration, la prise de l'image du gel d'agarose se fait à l'aide de l'appareil photo **Transilluminator UVP** par l'ordinateur pour procéder à la lecture des bandes.

La prise de l'image se fait de la manière suivante :

- Allumer l'ordinateur ;
- Placer le gel dans la chambre UV munie de camera ;
- Vérifier si le gel est bien placé ;
- Ouvrir le Logiciel **Launch Doc-ItLS** sur l'ordinateur ;
- Cliquer sur **Camera** ensuite ;
- Allumer le photomètre avant de cliquer sur **Start Preview** ;
- Cocher la case **Color capture** ;
- Cliquer sur **capturer** ;
- Prendre la photo sans couleur en décochant la case **Color Capture** ;
- Puis enregistrer en cliquant sur **Save as**.

L'introduction d'un marqueur de taille (ou de poids moléculaire) comme standard qui migre en même temps que les échantillons à tester permet la détermination de la taille des bandes.

La présence d'une bande de taille spécifique sur le gel d'agarose se traduit alors par la présence du micro-organisme recherché.

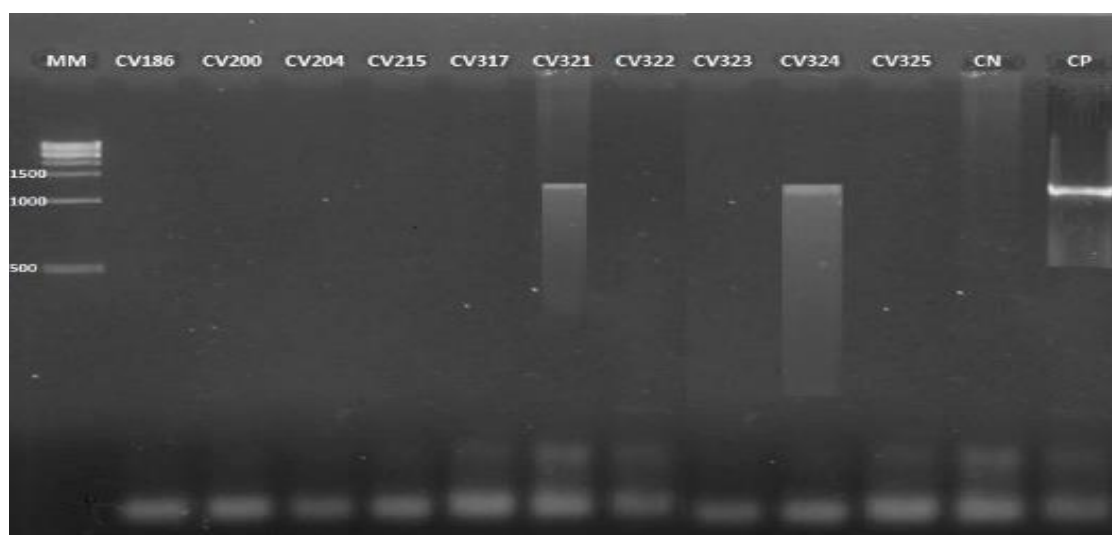


Figure 4 : gel d'agarose des échantillons positifs à *Brucella spp.* en utilisant les amorces *Omp2a* (Source LBMA, cette étude 2019).

Le MM désigne le marqueur moléculaire de 1kb, les échantillons CV321 et CV324 apparus au niveau de 1100 bp sont des échantillons positifs à *Brucella spp.*, les autres échantillons (CV186, CV200, CV204, CV215, CV317, CV322, CV323, CV325) sont négatifs, le CN et le CP désignent respectivement le contrôle négatif et positif.

NB : La taille attendue pour nos résultats était de **1100 bp**.

4.7 Collecte saisie et analyse des données :

Un bulletin d'analyse médicale et une fiche d'enquête comportant les renseignements sociodémographiques et cliniques des patientes ont été préétablis pour la collecte des données. Les logiciels Word 2016, Excel 2016, SPSS version 20, Epi info 7 ont servi pour la saisie, le traitement et l'analyse des données.

Les proportions ont été comparées avec le test statistique Chi-2, avec le risque $\alpha = 0,05$.

5 RESULTATS

5.1 Résultats descriptifs

5.1.1 Résultats sociodémographiques

Tableau II : Répartition des patientes selon la tranche d'âge.

Tranche d'âge	Effectif	Pourcentage
15-20	87	23,6
20-25	96	26,1
25-30	86	23,4
30-35	55	14,9
35-40	24	6,5
40-45	2	0,5
Autres	18	4,9
Total	368	100

Autres : tous les âges non renseignés.

La tranche d'âge 20-25 a été prédominante, suivie de 15-20 et de 25-30 avec respectivement 26,1 % ; 23,6 % ; 23,4 %.

Tableau III : Répartition des patientes selon la profession.

Profession	Effectif	Pourcentage
Agent de santé	6	1,6
Coiffeuse/Couturière/Teinturière	18	4,9
Commerçant	35	9,5
Elève/ Etudiant	19	5,2
Employé de bureau	16	4,3
Ménagère	168	45,7
Autres	106	28,8
Total	368	100,0

Autres : toutes les professions non renseignées.

La majorité de nos patientes (soit 45,7 %) était des Ménagères.

Tableau IV : Répartition des patientes par Commune.

Commune	Effectif	Pourcentage
Commune I	0	0,0
Commune II	2	0,5
Commune III	1	0,3
Commune IV	3	0,8
Commune V	256	69,6
Commune VI	28	7,6
Commune de Kati	63	17,2
Autres	14	3,8
Total	368	100,0

Autres : toutes les patientes venues des régions.

Parmi les patientes **69,6 %** résidaient dans la **Commune V**.

5.2 Résultats analytiques

5.2.1 Résultats des tests sérologiques

Tableau V : Répartition des patientes selon les résultats sérologiques.

Sérologie	Effectif	Pourcentage
Négatif	346	94,0
Positif	22	6,0
Total	368	100,0

La prévalence de l'infection à *Brucella* par la méthode sérologique de Rose Bengale était de 6 %.

Tableau VI : Répartition des échantillons positifs au test de Rose Bengale selon la tranche d'âge.

Tranche d'âge	Effectif	Pourcentage
15-20	6	27,3
20-25	5	22,7
25-30	3	13,6
30-35	5	22,7
Autres	3	13,6
Total	22	100,0

Autres : tous les âges non renseignés.

Parmi les échantillons positifs au test sérologique de Rose Bengale, la tranche d'âge de 15-20 a été la plus représentée avec 27,3 % suivie de 20-25 et de 30-35 avec chacune 22,7 %.

Tableau VII : Répartition des échantillons positifs au test de Rose Bengale selon la profession.

Profession	Effectifs	Pourcentage
Coiffeuse/Couturière/Teinturière	1	4,5
Elève/ Etudiant	2	9,1
Ménagère	13	59,1
Commerçant	2	9,1
Autres	4	18,2
Total	22	100,0

Autres : toutes les professions non renseignées.

Parmi les échantillons positifs au test de Rose Bengale **59,1 %** était des ménagères.

Tableau VIII : Répartition des échantillons positifs au test de Rose Bengale par Commune.

Commune	Effectifs	Pourcentage
Commune II	1	4,5
Commune IV	1	4,5
Commune V	16	72,7
Commune de Kati	2	9,1
Autres	2	9,1
Total	22	100,0

Autres : toutes les patientes venues des régions.

Parmi les échantillons positifs au test de Rose Bengale, la majorité (soit **72,7 %**) des patientes résidait dans la Commune V.

5.2.2 Résultats des tests moléculaires

Tableau IX : Répartition des échantillons en fonction de la détection du gène *Omp2a* de *Brucella*.

PCR	Effectif	Pourcentage
Négatif	335	91,0
Positif	33	9,0
Total	368	100,0

La prévalence de l'infection à *Brucella spp.* était de **9 %** par la PCR.

Tableau X : Répartition des échantillons positifs à la PCR selon la tranche d'âge.

Tranche d'âge	Effectifs	Pourcentage
15-20	9	27,3
20-25	8	24,2
25-30	7	21,2
30-35	6	18,2
35-40	2	6,1
Autres	1	3,0
Total	33	100,0

Autres : tous les âges non renseignés.

Les tranches d'âge **15-20** et **20-25** ont été les plus représentées parmi les échantillons positifs à la PCR avec respectivement **27,3 %** et **24,2 %**.

Tableau XI : Répartition des échantillons positifs à la PCR selon la profession.

Profession	Effectifs	Pourcentage
Agent de santé	1	3,0
Elève/Étudiant	2	6,1
Employé de bureau	1	3,0
Commerçant	2	6,1
Ménagère	15	45,5
Autres	12	36,4
Total	33	100,0

Autres : toutes les professions non renseignées.

Parmi les échantillons positifs à la PCR **45,5 %** étaient des ménagères.

Tableau XII : Répartition des échantillons positifs à la PCR par Commune.

Commune	Effectifs	Pourcentage
Commune II	1	3,0
Commune III	1	3,0
Commune V	20	60,6
Commune VI	3	9,1
Commune de Kati	6	18,2
Autres	2	6,1
Total	33	100,0

Autres : toutes les patientes venues des régions.

Parmi les échantillons positifs à la PCR, la majorité (soit **60,6 %**) des patientes résidait dans la Commune V.

Tableau XIII : Test de performance de la PCR par rapport au test de Rose Bengale dans le diagnostic.

Sérologie/ PCR		Sérologie		Total
		Positif	Négatif	
PCR	Positif	3	30	33
	Négatif	19	316	335
Total		22	346	368

Sensibilité $Se = [Vp / (Vp + Fn)] \times 100$; $Se = (3/22) \times 100 = 13,63 \%$.

Spécificité $Sp = [Vn / (Vn + Fp)] \times 100$; $Sp = (316/346) \times 100 = 91,32 \%$.

Valeur prédictive positive $VPP = [Vp / (Vp + Fp)] \times 100$; $VPP = (3/33) \times 100 = 9,01 \%$.

Valeur prédictive négative $VPN = [Vn / (Vn + Fn)] \times 100$; $VPN = (316/335) \times 100 = 94,32 \%$.

(Vp = vrais positifs, Vn = vrais négatifs, Fp faux positifs Fn = faux négatifs).

La prévalence moléculaire de l'infection à *Brucella* était légèrement élevée par rapport à la prévalence sérologique. La sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives de la PCR par rapport à la technique sérologique de Rose Bengale étaient respectivement **13,63 %**, **91,32 %**, **9,01 %** et **94,32 %**. Il n'existait pas de différence statistiquement significative (valeur de $p > 0,05$ avec $\alpha = 0,05$).

6 DISCUSSION

Cette étude apporte de nouvelles connaissances en matière de la brucellose chez les femmes enceintes, cependant les informations des patientes qui nous permettaient de renseigner nos fiches d'enquête n'étaient pas toujours disponibles.

L'étude s'est déroulée de mai à décembre 2019, au total **368** échantillons ont été collectés. Le choix des femmes enceintes comme population cible s'explique par le fait qu'elles sont sujettes à un avortement face à la brucellose. Le CSRéf de la Commune V est situé dans la même commune que le LBMA, c'est ainsi que nous l'avons choisi à cause de sa proximité pour l'échantillonnage, en plus il dispose d'un service de gynécologie approprié, quant au LBMA, c'est une structure de référence dans le domaine de la biologie moléculaire et de la recherche au Mali.

Actuellement, les tests basés sur la PCR sont d'une importance très capitale dans le diagnostic et la recherche. Ils sont utilisés pour la détection, le génotypage, la quantification d'agents pathogènes présents au cours de la maladie et présentent certains avantages, tels qu'une sensibilité élevée, une spécificité élevée, une reproductibilité et une facilité technique [45]. La technique de Rose Bengale indique que les sujets ont été exposés à l'agent pathogène à la suite d'une infection à *Brucella* [13]. Un test sérologique ne peut pas forcément montrer la présence du pathogène, il peut indiquer le niveau d'exposition du sujet à un pathogène dans le temps soit sur une période courte avec la présence des IgM (infection aiguë), ou sur une période longue avec la présence des IgG (infection chronique). Dans le diagnostic de la brucellose, l'utilisation des gènes codant pour les OMP présente un intérêt beaucoup plus particulier du fait que les OMP de *Brucella* sont impliquées dans la virulence et présentent une forte antigénicité.

Une étude réalisée par **Baddour** et *al.* en Arabie Saoudite dans le but d'évaluer les différentes techniques de PCR dans le diagnostic de la brucellose a rapporté une sensibilité de l'ordre de **88 %** et une spécificité de **100 %** avec l'utilisation des gènes codant pour les OMP comme amorces [57].

La tranche d'âge **20-25** était la plus représentée, soit **26,1 %**. Cette fréquence élevée pourrait être due au fait que les femmes sont plus susceptibles de tomber enceinte pendant cette période [58]. Cette tranche d'âge a été prédominante dans deux autres études chez les femmes enceintes, une menée par **Ali** et *al.* au Pakistan avec **49,2 %** [9] et l'autre menée par **Yousuf** et *al.* en Arabie Saoudite avec **35,0 %** [5].

Une étude réalisée par **Gustavo et al.** au Pérou a rapporté un résultat différent chez les femmes enceintes, la tranche d'âge **25-30** était la plus représentée avec **34,7 %**. Cela pourrait être due aux critères de participation de leur étude [59].

Les femmes enceintes ménagères étaient plus nombreuses avec un effectif de **168 femmes** soit **45,7 %**, cela s'explique par le fait que dans la population la majorité des femmes au foyer sont des ménagères. Une prédominance similaire de **34,3 %** des femmes ménagères a été obtenue à Mopti par **Sidibé** [60].

La majorité des patientes venait de la **Commune V** avec **69,6%**, à cause du fait que l'échantillonnage s'est passé dans le CSRéf de cette Commune, cela illustre la bonne marche de la politique sanitaire à Bamako.

La séroprévalence de la brucellose estimée par la technique de Rose Bengale au cours de cette étude était de **6,0 %**, deux études ont rapporté des résultats similaires : une réalisée en Turquie de 2003 à 2008 par **Kurdoglu et al.** qui ont obtenu **6,1 %** de femmes enceintes séropositives [7] et l'autre menée par **Ali et al.** au Pakistan en 2016 avec une prévalence de **5,8 %** chez les femmes enceintes [9].

Une étude réalisée au Rwanda en 2014 a rapporté un taux de séroprévalence différent, soit **25,0 %** chez les femmes enceintes[10]. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les échantillons utilisés dans leur étude provenaient des femmes ayant déjà eu un ou plusieurs avortements.

Le résultat obtenu avec la PCR était de **9,0 %**, un résultat proche à celui-ci a été rapporté en 2017 par **Mujuni et al.** en Tanzanie avec **10,8 %** de positif à la PCR chez des femmes enceintes [61]. Dans une étude réalisée par **Elshamy et al.** en Arabie Saoudite d'août 2005 à décembre 2007, ils ont rapporté une prévalence légèrement élevée, soit **12,2 %** [8].

Une prévalence plus élevée de **29,0 %** a été observée en Syrie par **Alsayed et al.** avec la PCR, cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la Syrie est l'un des pays les plus touchés au monde par la brucellose qui a connu une réémergence dans ce pays à cause de l'impact des conflits sur l'effondrement des système de santé [62,63].

En termes d'analyse de concordance entre les tests de Rose Bengale (sérologie) et de PCR (Biologie Moléculaire), la sensibilité et la spécificité étaient légèrement élevées avec la PCR comparée à la technique de Rose Bengale (choisi comme test standard).

Les résultats de la sensibilité et de la spécificité de la PCR par rapport à la sérologie au cours de notre étude étaient respectivement de **13,6 %** et de **91,3 %**. Ce qui diffère des résultats d'une étude réalisée chez la population générale au Mali par Traore dont la spécificité pour détecter la brucellose était **77,4 %** et la sensibilité **60,0 %** [11]. Ceci diffère également des résultats de Masallat et *al.* en Egypte où la sensibilité était **96,3 %** et la spécificité **100 %** [64].

Les raisons possibles de cette différence peuvent être l'utilisation de paires d'amorces différentes, dans notre étude nous avons utilisé les gènes codants pour les protéines de la membrane qui présentent une sensibilité et une spécificité moins élevées que les amorces utilisées dans les deux autres études.

7 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

7.1 Conclusion

Les résultats de notre étude démontrent la présence de la brucellose chez les femmes enceintes en commune V du district de Bamako. Du fait de l'absence de test diagnostic en faveur de cette maladie, la brucellose est peu diagnostiquée dans nos structures de santé. Au terme de cette étude nous avons obtenu une prévalence de **6,0 %** au test sérologique de Rose Bengale et **9,0 %** pour la PCR détectant les gènes *Omp2a*. Ceci prouve que le diagnostic de la brucellose doit être inclus dans le bilan prénatal pour éviter toutes confusions avec d'autres maladies et assurer une meilleure prise en charge. Notre étude montre également que les techniques moléculaires pourraient être utilisées de façon complémentaire avec sérologie pour un meilleur contrôle de cette maladie.

7.2 Perspectives

Notre étude réalisée au CSRéf de la Commune V du District de Bamako concernait 368 femmes enceintes venues en consultation prénatale. Aussi pour les prochaines recherches, il serait intéressant d'étendre aux autres CSRéf pour avoir d'autres population de femmes enceintes.

D'autre part, il serait intéressant d'envisager une étude conjointe avec les services vétérinaires pour voir comment les choses se passent à leur niveau, s'il y a abatage et indemnisation et voir quels sont les types de tests qu'ils utilisent afin de comparer avec les tests que nous avons utilisés.

Les suites de notre travail de recherche pourraient également se pencher sur l'inclusion des autres femmes ménagères non enceintes par ce qu'elles représentaient la classe la plus touchée parmi les échantillons positifs.

8 RECOMMANDATIONS

❖ Au Ministère de la Santé

- Intégrer la brucellose parmi les maladies à surveiller dans le cadre de la plateforme une Seule Santé.
- Etablir une coordination entre le LCV et les structures de recherche pour une meilleure surveillance de la brucellose au Mali.

❖ Au CSRéf de la Commune V

- Mettre à la disposition du laboratoire du CSRéf la technique de Rose Bengale qui est facile à mettre en œuvre et pouvant détecter une exposition à l'infection à *Brucella*.
- Etablir une collaboration avec les structures universitaires telles que le LBMA pour valider les échantillons positifs à la technique de Rose Bengale.
- Recueillir les données sociodémographiques pour la traçabilité des patients porteurs des anticorps dirigés contre *Brucella*.

❖ Au LBMA

- Mettre sa plateforme moléculaire à disposition pour appuyer le diagnostic de la brucellose au niveau des CSRéf notamment celui de la Commune V.

9 REFERENCES

1. Galińska EM, Zagórski J. Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms. *Ann Agric Environ Med.* 2013;20(2):6.
2. Franc KA, Krecek RC, Häsler BN, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health.* déc 2018;18(1):125.
3. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* févr 2006;6(2):91-9.
4. Maurin M, Brion J-P. Brucellose. *EMC - Mal Infect.* janv 2009;6(1):1-12.
5. Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in Pregnant Women. *Clin Infect Dis.* 15 avr 2001;32(8):1172-7.
6. Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Pregnancy associated brucellosis. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* avr 2013;8(1):47-50.
7. Kurdoglu M, Adali E, Kurdoglu Z, Karahocagil MK, Kolusari A, Yildizhan R, Kucukaydin Z, Sahin HG, Kamaci M, Akdeniz H. Brucellosis in pregnancy: a 6-year clinical analysis. *Arch Gynecol Obstet.* févr 2010;281(2):201-6.
8. Elshamy M, Ahmed AI. The effects of maternal brucellosis on pregnancy outcome. *J Infect Dev Ctries.* 1 juin 2008;2(3):230-4.
9. Ali S, Akhter S, Neubauer H, Scherag A, Kesselmeier M, Melzer F, Khan I, El-Adawy H, Azam A, Qadeer S, Ali Q. Brucellosis in pregnant women from Pakistan: an observational study. *BMC Infect Dis.* 02 2016;16:468.
10. Rujeni N, Mbanzamihiho L. Prevalence of Brucellosis among Women Presenting with Abortion/Stillbirth in Huye, Rwanda. *J Trop Med.* 29 juin 2014;2014:740479.

11. Traoré M. Intérêt du diagnostic moléculaire des pathogènes intracellulaires : cas de la brucellose et de la toxoplasmose à Bamako. Thèse en Pharmacie. USTTB, Faculté de Pharmacie; 2019. N°99.
12. Boukary, Saegerman C, Adehossi EO, Matthys F, Vias GF, Yenikoye A, Thys E. La brucellose en Afrique subsaharienne. In 2014. p. 39-56.
13. Roux J. Le diagnostic biologique des brucelloses chez l'homme. Médecine Mal Infect. 1 mai 1974;4(5):259-66.
14. Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet J-Y, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. Vet Microbiol. 20 déc 2002;90(1-4):229-47.
15. Maurin M. La brucellose à l'aube du 21e siècle. Médecine Mal Infect. janv 2005;35(1):6-16.
16. Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Front Microbiol. 2014;5:213.
17. Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol. juin 2010;5(6):859-66.
18. Tiller RV, Gee JE, Frace MA, Taylor TK, Setubal JC, Hoffmaster AR, De BK. Characterization of Novel *Brucella* Strains Originating from Wild Native Rodent Species in North Queensland, Australia. Appl Environ Microbiol. 1 sept 2010;76(17):5837-45.
19. Bamaiyi PH. Prevalence and risk factors of brucellosis in man and domestic animals: A review. Int J One Health. 2016;2:29-34.
20. Khan M, Zahoor M. An Overview of Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies. Trop Med Infect Dis. 14 juin 2018;3(2):65.
21. Godfroid J, Garin-Bastuji B, Saegerman C, Blasco JM. Brucellosis in terrestrial wildlife: -EN- -FR- -ES-. Rev Sci Tech OIE. 1 avr 2013;32(1):27-42.
22. Alton GG, Forsyth JRL. *Brucella*. In: Microbiologie médicale. 4e édition. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.

23. Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Brucella. In: Précis de bactériologie clinique. ESKA 2000. Paris; 2000. p. 1413-23.
24. Mangalgi S, Sajjan A. Comparison of Three Blood Culture Techniques in the Diagnosis of Human Brucellosis. J Lab Physicians. janv 2014;6(01):014-7.
25. Carpio JMC, Mingala CN. Outer membrane proteins: its role in Brucella virulence and immunogenicity. Int J Vet Sci. 2018;7(1):33-7.
26. Cutler S, Whatmore AM, Commander N. Brucellosis - New aspects of an old disease. J Appl Microbiol. 1 févr 2005;98(6):1270-81.
27. Paerregaard A, Espersen F, Høiby N. Cross-reactions between *Yersinia enterocolitica* serogroup 0:3 and other serogroups of the same species, as well as thirty-four other bacterial species. APMIS. janv 1988;96(1-6):315-24.
28. Wang Z, Bie PF, Cheng J, Wu QM, Lu L. In vitro evaluation of six chemical agents on smooth Brucella melitensis strain. Ann Clin Microbiol Antimicrob. déc 2015;14(1):16.
29. Teixeira-Gomes AP, Cloeckaert A, Zygmunt MS. Characterization of Heat, Oxidative, and Acid Stress Responses in Brucella melitensis. Burns DL, éditeur. Infect Immun. 1 mai 2000;68(5):2954-61.
30. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, Memish ZA, Roushan MRH, Rubinstein E, Sipsas NV, Solera J, Young EJ, Pappas G. Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations. PLoS Med. 27 déc 2007;4(12):e317.
31. Roux J. Epidémiologie et prévention de la brucellose. Bull World Health Organ. 1979;57(2):179-94.
32. Calvet F, Heaulme M, Michel R, Demoncheaux J-P, Boue S, Girardet C. Brucellose et contexte opérationnel. Médecine Armées. 2010;38(5):429-34.
33. Chakroun M, Bouzouaia N. La brucellose : une zoonose toujours d'actualité brucellosis : a topical zoonosis. Avril 07;1(2):10.

34. Tuon FF, Gondolfo RB, Cerchiari N. Human-to-human transmission of *Brucella* - a systematic review. Trop Med Int Health. mai 2017;22(5):539-46.
35. López-Santiago R, Sánchez-Argáez AB, De Alba-Núñez LG, Baltierra-Uribe SL, Moreno-Lafont MC. Immune Response to Mucosal Brucella Infection. Front Immunol. 20 août 2019;10:1759.
36. Caron E, Peyrard T, Köhler S, Cabane S, Liautard JP, Dornand J. Live Brucella spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. Infect Immun. déc 1994;62(12):5267-74.
37. Smith LD, Ficht TA. Pathogenesis of Brucella. Crit Rev Microbiol. 1 janv 1990;17(3):209-30.
38. He Y. Analyses of Brucella Pathogenesis, Host Immunity, and Vaccine Targets using Systems Biology and Bioinformatics. Front Cell Infect Microbiol. 1 févr 2012;2:2.
39. Chaplin DD. Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol. févr 2010;125(2):S3-23.
40. Michaux-Charachon S, Foulongne V, O'Callaghan D, Ramuz M. Brucella à l'aube du troisième millénaire : organisation du génome et pouvoir pathogène. Pathol Biol. 1 juill 2002;50(6):401-12.
41. Aydın B, Beken S, Akansel R, Dilli D, Okumuş N, Zenciroğlu A, Tanır G. Prematurity due to maternal brucella infection and review of the literature. Turk J Pediatr. août 2013;55(4):433-7.
42. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. Croat Med J. août 2010;51(4):296-305.
43. Castaneda MR. A Practical Method for Routine Blood Cultures in Brucellosis. Exp Biol Med. 1 janv 1947;64(1):114-5.
44. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Antimicrob Agents. nov 2010;36:S12-7.

45. Wang Y, Wang Z, Zhang Y, Bai L, Zhao Y, Liu C, Ma A, Yu H. Polymerase chain reaction–based assays for the diagnosis of human brucellosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* déc 2014;13(1):31.
46. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol.* déc 2002;90(1-4):435-46.
47. Goolab S, Roth RL, van Heerden H, Crampton MC. Analyzing the molecular mechanism of lipoprotein localization in *Brucella*. *Front Microbiol.* 28 oct 2015;6.
48. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiol Read Engl.* sept 1995;141 (Pt 9):2111-21.
49. Andriopoulos P, Tsironi M, Deftereos S, Aessopos A, Assimakopoulos G. Acute brucellosis: presentation, diagnosis, and treatment of 144 cases. *Int J Infect Dis.* janv 2007;11(1):52-7.
50. Alavi SM, Alavi L. Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years. *Casp J Intern Med.* 2013;4(2):636-41.
51. Kosevska E, Donev D, Kuzmanovska G, Karamandi-Lazarovska V, Petlichkovska S. Health Promotion and Prevention of Human Brucellosis in the Republic of Macedonia. *Maced J Med Sci.* 15 sept 2010;3(3):283-8.
52. Tabar H, Gholamreza. Preventive and Control Programme for Brucellosis in Human and Animals – A review article. :23.
53. LBMA: un labo, pour assurer le développement du Mali par la biologie moléculaire | | JSTM [Internet]. 2019 [cité 25 août 2020]. Disponible sur: <https://www.jstm.org/lbma-un-labo-pour-assurer-le-developpement-du-mali-par-la-biologie-moleculaire/>
54. Services des Ressources humaines du CSRéf CV. Monographie historique du centre de sante de référence de la Commune V. 2020.
55. C. E. Schwartz Daniel — Méthodes statistiques à l’usage des médecins et des biologistes. *Population.* 1964;19(5):1004-1004.

56. Piranfar V, Sharif M, Hashemi M, Vahdati AR, Mirnejad R. Detection and discrimination of two *Brucella* species by multiplex real-time PCR and high-resolution melt analysis curve from human blood and comparison of results using RFLP. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(9):6.
57. Baddour MM, Alkhalifa DH. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol.* mai 2008;54(5):352-7.
58. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice and Practice Committee. Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589. *Fertil Steril.* mars 2014;101(3):633-4.
59. Vilchez G, Espinoza M, D'Onadio G, Saona P, Gotuzzo E. Brucellosis in pregnancy: clinical aspects and obstetric outcomes. *Int J Infect Dis.* 1 sept 2015;38:95-100.
60. Sidibé M dite D. Séroprévalence de la brucellose humaine dans la zone peri-urbaine de la région de Mopti. Thèse en Pharmacie. Université de Bamako, Faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie; 2011. N°18.
61. Mujuni F, Andrew V, Mngumi EB, Chibwe E, Mshana SE, Mirambo MM. Predominance of *Brucella abortus* antibodies among women with spontaneous abortion in the city of Mwanza: unrecognized link or coincidence? *BMC Res Notes.* déc 2018;11(1):792.
62. Alsayed Y, Monem F. Brucellosis laboratory tests in Syria: what are their diagnostic efficacies in different clinical manifestations? *J Infect Dev Ctries.* 3 mai 2012;6(06):495-500.
63. Petersen E, Baekeland S, Memish ZA, Leblebicioglu H. Infectious disease risk from the Syrian conflict. *Int J Infect Dis.* sept 2013;17(9):e666-7.
64. Masallat D, Moemen D, Eid MI. PCR Versus Serology for Diagnosing of Brucellosis in Pregnant Women : Mansoura University Hospital Experience. *Egypt J Med Microbiol.* oct 2013;22(4):133-8.

10 ANNEXE

Formulaire d'investigation

SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE ET DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE AU CENTRE DE SANTE DE REFERENCE DE LA COMMUNE V

RECUEIL DES DONNES :

N^o fiche : Date : /...../2019

Q1) Unité : Consultation Externe:/...../ CPN : /...../ Urgence : / Autres : /...../

– DONNES SOCIODEMOGRAPHIQUES :

Q3) Nom/Prénom: Q4) Age: /...../

Q5) Résidence: /...../ Q6) Tel : /...../

Q7) Profession : /...../ Q8) Ethnie: /...../

Q9) Mode de vie : Viande: /...../ Lait frais: /...../ Cohabitation avec les animaux: /...../

– RENSEIGNEMENTS CLINIQUES :

Q10) Femme non enceinte:/...../

Q11) Femme enceinte:/...../ Si Oui Terme de la grossesse:/.....sa+.....Jr/

Q12) Motif de consultation :..... Q13) Signes fonctionnels : Fièvre: /...../

Céphalée: /..../ Courbature: /...../ Asthénie: /..... Q14) Examen général : Etat général: /...../

Constantes: // Q15) Examen obstétricaux : HU://, BDCF: /...../,
TV: /...../

Q16) Examens biologiques : Sérologie:/...../ Positif:/...../Négatif:/...../

PCR:/...../ Positif:/...../Négatif:/...../

Q17) Souche de Brucella: /...../

– TRAITEMENT (si positif) :

Q18) Régime 1:/...../ Q19) Régime 2:/...../

– ISSUE DE LA GROSSESSE :

Q20) Fausse couche: /...../ Accouchement prématuré: /...../ Grossesse arrêtée : /...../

Normal: /.... /

– **NOUVEAU-NE :**

Q21) Vivant: /...../ Score d'APGAR 1-3/...../ 4-7/...../ 8-10/...../

Q22) Mort fœtale in utero/...../ Mort-né frais/...../

Q23) Voie d'accouchement : Voie basse: /...../ Voie haute : /...../

Q24) Décès néo-natal : Oui/...../ Non/...../

– **EVOLUTION :**

○ A J7 :

.....
.....
.....
.....

○ A J15 :

.....
.....
.....
.....

**LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APLLIQUEE (LBMA)-
Faculté des sciences et techniques**

Colline de Badalabougou tel : 20 23 79 25

BULLETIN D'ANALYSE

Nom : Prénom :
Sexe : Age : Profession..... Résidence.....

Consommation de lait cru Oui Non

Nature de l'examen	Résultats
Renseignements cliniques	

Bamako, le/...../20.....

Bamako, le/...../20.....

Le médecin traitant

Le Biologiste

FICHE SIGNALITIQUE

**Nom : KABA****Ville de soutenance : Bamako****Prenom : Souleymane****Section : Pharmacie****Email : kaba.s7788@yahoo.fr****Nationalité : Malienne****Année universitaire : 2019-2020****Contact : 00223 77 88 93 35**

Titre de la thèse : Contribution au diagnostic de la brucellose chez les femmes enceintes dans la Commune V du district de Bamako.

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie et de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie.

Secteur d'intérêt : Biologie Moléculaire, Parasitologie, Bactériologie, Santé publique.

RESUME

La brucellose est une maladie infectieuse commune à l'homme et à certains animaux due à des bactéries du genre *Brucella*. La présence de cette maladie chez les femmes enceintes peut avoir plusieurs conséquences sur la grossesse ainsi que la santé de l'enfant d'où l'intérêt de cette étude dont l'objectif était de contribuer à un meilleur contrôle de la brucellose à travers le dépistage de la maladie chez les femmes enceintes dans la commune V district de Bamako.

Notre étude a porté sur 368 échantillons de femmes enceintes au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée, de mai à décembre 2019. Nous avons utilisé la méthode de Rose Bengale pour le test sérologique. Les ADN ont été extraits par la méthode de Salting Out et l'identification moléculaire par la PCR détectant les gènes cibles *Omp2a* codant pour les protéines de la membrane externe de *Brucella*.

Les résultats de notre étude, **9,0 %** pour la PCR et **6,0 %** pour la sérologie, démontrent que le diagnostic de la brucellose doit être inclus dans le bilan prénatal et que les techniques moléculaires pourraient être utilisées de façon complémentaire à la sérologie pour un meilleur contrôle de cette maladie.

Mots clés : *Brucella*, Bamako, femmes enceintes, PCR, *Omp2a*.

IDENTIFICATION SHEET**Last Name : KABA****City of defense : Bamako****First Name : Souleymane****Section : Pharmacy****Email : kaba.s7788@yahoo.fr****Nationality : Malian****Academic Year : 2019-2020****N° Phone : 00223 77 88 93 35**

Title of the thesis : Contribution to the diagnosis of brucellosis in pregnant women in Commune V of Bamako district.

Place of deposit : Library of Faculty of Pharmacy and Faculty of Medicine and Odontostomatology.

Sectors of interest : Molecular Biology, Parasitology, Bacteriology, Public Health.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease common to humans and some animals caused by bacteria of the genus *Brucella*. The presence of this disease in pregnant women can have several consequences on pregnancy as well as on the health of the child, hence the interest of this study whose objective was to contribute to better control of brucellosis through the screening for the disease in pregnant women in the commune V district of Bamako.

Our study focused on 368 samples from pregnant women at the Laboratory of Applied Molecular Biology, from May to December 2019. We used the Rose Bengal method for the serological test. The DNAs were extracted by the Salting Out method and molecular identification by PCR detecting the *Omp2a* target genes encoding the proteins of the outer membrane of *Brucella*.

The results of our study, 9.0 % for PCR and 6.0 % for serology, demonstrate that the diagnosis of brucellosis must be included in the prenatal workup and that molecular techniques could be used in addition to serology for better control of this disease.

Keywords: *Brucella*, Bamako, pregnant women, PCR, *Omp2a*.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels ;

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ;

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure!