

REPUBLIQUE DU MALI  
*Un Peuple-Un But-Une Foi*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

N° 069

**IDENTIFICATION DES SOUCHES D'*Escherichia coli* DANS LES SELLES EN RAPPORT AVEC LA MALNUTRITION A DIORO**

Thèse présentée et soutenue publiquement le 12/07/2018 devant la faculté de pharmacie pour  
obtenir le grade de

**DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)**

Par

**M. DIASSANA Abraham**

**JURY**

**Président du jury :**

**Professeur Ibrahim MAIGA**

**Membres :**

**Docteur Djibril Mamadou COULIBALY**

**Docteur Oumar KONE**

**Co-directeur de thèse :**

**Docteur Lassina DOUMBIA**

**Directeur de thèse :**

**Professeur Ousmane KOITA**

# LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

## ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2017-2018

### ADMINISTRATION :

**Doyen :** Boubacar TRAORE, Professeur

**Vice-doyen :** Ababacar I. MAIGA, Professeur

**Secrétaire principal :** Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

**Agent comptable :** Famalé DIONSAN, Contrôleur des Finances.

### LES PROFESSEURS HONORAIRES

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Boulkassoum	HAIDARA	Législation
M. Moussa	Feu HARAMA	Chimie Organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
M. Alou A.	KEÏTA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Bréhima	KOUMARE	Bactériologie et Virologie
M. Abdrahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

### DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

#### PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie /Parasitologie
M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

**MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye	DJIMDE	Bactériologie-Virologie
M. Akory Ag	IKNANE	Santé Publique-Nutrition
M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>chef de DER</b>
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé Environnement

**MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
M. Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique Biostatistiques
M. Issiaka	SAGARA	Santé Publique Biostatistiques
Mme. Fanta	SANGHO	Santé Publique
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique Biostatistiques

**ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
Mme. Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
Mme. Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
M. Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie Méd
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
Mme. Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
M. Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
Mme. Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEÏTA	Santé Publique/Santé Environ.
M. N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
M. Birama Apho	LY	Santé Publique
M. Yacouba	MAÏGA	Biostatistiques
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie

M. Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

## **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

### **PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saïbou	MAÏGA	Législation
Mme. Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

### **MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

#### **MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. Loseni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Yaya	COULIBALY	Législation
Mme. Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

#### **ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
M. Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
M. Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation
M. Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
M. Ahmed	MAÏGA	Législation
Mme Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
Mme. Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

**DER : SCIENCES DU MEDICAMENT****PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
M. Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

**MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

M. Sékou	BAH	Pharmacologie
M. Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique

**MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie

**ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
M. Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
M. Abdrahamane	DIARA	Toxicologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

**DER : SCIENCES FONDAMENTALES****PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE**

M. Cheick F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

**MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE**

M. Mouctar	DIALLO	Biologie <b>Chef de DER</b>
M. Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

**MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE****ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

M. Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
M. Modibo	DIALLO	Génétique
M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
M. Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale
M. Moussa	KONE	Chimie Organique
M. Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

**CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

M. Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BAH	Anatomie
M. Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie
M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Biologie Végétale, Botanique
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I.	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubakary	MAÏGA	Chimie Organique
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
Mme. Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
M. Fana	TANGARA	Mathématique
M. Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

# **Dédicace et remerciements**

## **Dédicace :**

---

Je dédie cette thèse à :

Mon père pour ton soutien qui me fut très utile.

Ma mère pour tous les services rendus sans rien attendre en retour.

Mes tontons pour leurs conseils et soutiens.

Mes frères et sœurs pour leur encouragement.



## **Remerciements :**

---

Mes sincères remerciements s'adressent :

### **A L'ETERNEL DIEU**

Pour la santé, la force, la patience et le courage que tu m'as donné et qui m'ont permis de surmonter les difficultés rencontrées lors de ma formation et de la réalisation de cette thèse.

#### **A mon père :**

Pour son soutien infaillible et inconditionnel depuis que j'ai vu le jour jusqu'à aujourd'hui. Tu n'as cessé de nous inculquer les valeurs du travail bien accompli. Il est clair et évident que jusqu'à la fin des temps, je ne pourrai jamais te récompenser pour ce que tu as fait pour moi. Que le SEIGNEUR te récompense.

#### **A ma mère :**

Que des souffrances et des souffrances endurées pour nous, tes enfants. Il est aussi clair et évident que jusqu'à la fin des temps, je ne pourrai jamais vous récompenser pour ce que vous avez fait pour moi. Tu as fait preuve d'amour maternel irréprochable. Que le SEIGNEUR te récompense.

#### **A mes tontons et mes tantes :**

Ce travail est le fruit de vos remarques pertinentes et de vos bénédictions qui n'ont jamais manqué, recevez ici toute ma reconnaissance.

#### **A mes frères, sœurs, cousines et cousins :**

Merci pour vos contributions qui ont été d'une importance capitale pour moi. Grace à vos conseils j'ai toujours eu cette confiance en moi. Merci pour m'avoir aidé à nourrir et entretenir cette ambition de devenir Pharmacien.

#### **A mes amis :**

J'ai passé tous ces moments de la faculté à vos côtés. J'avoue que j'ai partagé de ces instants de galère avec vous que je ne pourrais oublier. Ces moments m'ont aidé à me forger un caractère d'homme réaliste et optimiste, aussi, j'ai passé des moments très agréables avec vous qui vont sans nul doute me manquer. Avec vous, j'ai vu les défis de la vie se transformer en acquis. Grand merci à vous tous. Vous êtes plus que des amis, vous êtes de la famille.

#### **A tout le personnel du LBMA :**

Grand merci pour tout ce que j'ai appris et que je continue d'apprendre avec vous.

#### **A tout le personnel de la Pharmacie Mohamed V :**

Merci pour votre soutien et votre sens élevé de compréhension.

#### **A mes maîtres de la faculté de Pharmacie :**

Pour leur enseignement édifiant et instructif.

#### **Aux membres de la Promotion Pr N'Golo DIARRA :**

La neuvième promotion du numerus clausus ; j'ai tissé de bon lien avec vous et j'espère que nous continuerons cette sincère collaboration dans la vie professionnelle.

**A mes aînés de la faculté de Pharmacie :**

Je vous remercie pour avoir valablement joué votre rôle protecteur et affectif d'aîné.

**A mes jeunes frères académiques :**

Vous m'avez toujours réservé cette place d'aîné à la faculté et partout ailleurs. Soyez rassurés, non seulement je vous remercie sincèrement pour ces considérations mais je vous fais l'assurance d'assumer ce rôle d'aîné que vous pourrez attendre de ma modeste personne.

**HOMMAGES AUX**

**MEMBRES DU JURY**

## **Hommages aux membres du jury**

---

### **A notre Maitre et Président du Jury**

#### **Professeur Ibrahim MAIGA**

- Médecin biologiste
- Chef de service du laboratoire du CHU du Point-G
- Professeur de bactériologie et de virologie à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie
- Ancien Vice-Doyen de la FMPOS.

Cher Maître,

Nous nous réjouissons de votre présence comme président pour juger ce travail malgré vos multiples occupations. Permettez-nous de vous remercier pour l'honneur que vous nous faite en cela.

Nous avons admiré vos qualités scientifiques, pédagogiques et humaines tout le long de notre formation.

Votre modestie et votre caractère scientifique élevé font de vous un maitre exemplaire.

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

## **A notre Maître et Juge**

### **Docteur Djibril Mamadou Coulibaly**

- Pharmacien biologiste
- Assistant en biochimie clinique (FAPH) et Praticien Hospitalier

Cher Maître,

C'est un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Vous nous avez reçus avec beaucoup d'amabilité.

Votre modestie et votre ouverture au monde des apprenants vous procurent respect et considération.

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

**A notre Maître et Juge**

**Docteur Oumar KONE**

- Spécialiste en Maladies Infectieuses et Tropicales
- Coordinateur clinique du projet « Presidents Malaria Initiatives » (PMI/LBMA)

Cher Maître,

Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre souci du travail bien fait et votre faculté d'écoute ont forcé notre admiration.

Nous avons été marqués par votre simplicité et votre courtoisie.

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

**A notre Maître et co-directeur de thèse**

**Docteur Lassina DOUMBIA**

- Docteur en Pharmacie

Cher Maître,

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

Vous nous aviez été accessibles, du début de ce travail jusqu'à la fin.

Votre modestie et votre ouverture au monde des apprenants vous procurent respect et considération.

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

## **A notre Maître et Directeur de thèse**

### **Professeur Ousmane KOITA**

- Pharmacien Biologiste
- Professeur titulaire de Parasitologie Moléculaire
- Responsable des cours de Biologie Moléculaire appliquée à la Faculté des Sciences et Technique (FST) et Biologie Animale à la Faculté de Pharmacie (FAPH)
- Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA)
- Ancien Directeur Adjoint du programme SEREFO

Cher Maître,

Nous avons été très séduits par votre conviction pour la recherche, votre disponibilité et la qualité de votre enseignement.

Vous avez été toujours ouvert aux étudiants et vous nous avez toujours appris que « pour un étudiant rien ne valait une formation de qualité »

Vous nous avez accueillis à bras ouvert au LBMA, initié dans la recherche et fini par diriger les activités de notre thèse, ce qui fait de ce travail, le vôtre.

Ce fut un honneur pour nous d'être comptés parmi vos élèves.

Que l'ÉTERNEL vous accorde santé et longue vie afin que d'autres générations d'apprenants puissent bénéficier de la qualité de votre enseignement.

Amen



## Liste des abréviations

---

\* : Non identifiées

Ag : Antigène

ASACO : Associations de santé communautaire

CSCCom : Centre de Santé Communautaire

DEE : Dysfonctionnement Entérique Environnementale

DAEC : *Escherichia coli* Entero-adherent

EAEC : *Escherichia coli* Entéroagréatives

EHEC : *Escherichia coli* Entérohémorragiques

EIEC : *Escherichia coli* Entéroinvasives

EPEC : *Escherichia coli* Entéropathogènes

ETEC : *Escherichia coli* Entérotoxinogènes

FRC : Formulaire de report de cas

ICEMR : Centre International d'Excellence et de Recherche sur le Paludisme

INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique

LAZ : Length-Age-Z-Score

LBMA : Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée

MUG : 4-methyl-umbellifeny  $\beta$ -D-glucuronide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

TBE : Tris Borate EDTA (tris, acide borique et tétra diamine d'éthylène acide acétique)

TDA : Tryptophane Désaminase

UNICEF : United Nation International Children's Emergency Fund

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WAZ : Weight-Age-Z-Score

WLZ : Weight-Length-Z-Score

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I : Caractères biochimiques d'<i>E. coli</i></b> -----	<b>5</b>
<b>Tableau II : Principaux paramètres influençant la survie des bactéries dans l'environnement</b>	<b>7</b>
<b>Tableau III : Mise en évidence des phylogroupes d'<i>E. coli</i> en fonction des combinaisons de gènes recherchés</b> -----	<b>10</b>
<b>Tableau IV : Classification des sérotypes d'<i>E. coli</i> en sérotypotypes</b> -----	<b>11</b>
<b>Tableau V : Interprétation des caractères morphologiques des cultures sur la gélose d'Hektoen</b>	<b>27</b>
<b>Tableau VI : Liste des amorces utilisées pour l'identification des souches d'<i>E. coli</i></b> -----	<b>35</b>
<b>Tableau VII : Interprétation de l'Odds Ratio</b> -----	<b>36</b>
<b>Tableau VIII : Répartition des enfants en fonction de l'âge et du z-score poids/taille</b> -----	<b>38</b>
<b>Tableau IX : Répartition des groupes en fonction de la consommation du son de riz et/ou de la vitamine A</b> -----	<b>39</b>
<b>Tableau X : Répartition des échantillons de selles en fonction des résultats de la culture et des tests biochimiques</b> -----	<b>40</b>
<b>Tableau XI : Répartition des souches d'<i>E. coli</i> en fonction des groupes d'étude</b> -----	<b>40</b>
<b>Tableau XII : Répartition des échantillons en fonction des gènes et des pathovars détectés</b>	<b>42</b>
<b>Tableau XIII : Répartition des pathovars d'<i>E. coli</i> en fonction des groupes d'étude</b> -----	<b>43</b>

## Liste des figures

---

<b>Figure 1 : Cycle de vie d'<i>E. coli</i></b> .....	<b>8</b>
<b>Figure 2 : Cercle vicieux</b> .....	<b>17</b>
<b>Figure 3 : Situation géographique de la commune rurale de Dioro au Mali</b> .....	<b>19</b>
<b>Figure 4 : Image d'une gélose de Mac Conkey (image laboratoire)</b> .....	<b>25</b>
<b>Figure 5 : Image d'une gélose d'Hektoen (image laboratoire)</b> .....	<b>27</b>
<b>Figure 6 : Lecture et interprétation des tests biochimiques</b> .....	<b>32</b>
<b>Figure 7 : Impact de la consommation du son de riz sur la diarrhée</b> .....	<b>37</b>
<b>Figure 8 : Evolution de l'état nutritionnel des enfants au cours du suivi</b> .....	<b>38</b>
<b>Figure 9 : Répartition des groupes en fonction de la source d'approvisionnement en eau</b> -	<b>39</b>
<b>Figure 10 : Répartition des épisodes de diarrhée en fonction des groupes d'étude</b> .....	<b>40</b>
<b>Figure 11 : Image d'une PCR multiplexe (image laboratoire)</b> .....	<b>41</b>
<b>Figure 12 : Répartition des échantillons en fonction des selles diarrhéiques non diarrhéiques et des pathovars</b> .....	<b>42</b>

## Liste des annexes

---

<b>Annexe I : Composition de la gélose de Mac Conkey (BD DIFCO™)</b>	<b>I</b>
<b>Annexe II : Composition de la gélose d'Hektoen (BD DIFCO™)</b>	<b>I</b>
<b>Annexe III : Composition de la gélose de Kligler Hajna (BD BBL™)</b>	<b>II</b>
<b>Annexe IV : Composition de la gélose Citrate de Simmons (OXOID CM0155)</b>	<b>II</b>
<b>Annexe V : Composition du milieu Urée-Indole (BD DIFCO™)</b>	<b>III</b>
<b>Annexe VI : Composition de la gélose de MR-VP Médium (OXOID CM0043)</b>	<b>III</b>

## Table des matières

---

<b>Introduction :</b>	<b>1</b>
<b>Objectifs :</b>	<b>2</b>
• <b>Objectif général :</b>	<b>2</b>
• <b>Objectifs spécifiques :</b>	<b>2</b>
<b>1. Généralités :</b>	<b>3</b>
<b>1.1. <i>Escherichia coli</i> :</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Historique :</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2. Taxonomie :</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. Description d'<i>E. coli</i> :</b>	<b>3</b>
<b>1.1.4. Identification d'<i>Escherichia coli</i> sur les milieux nutritifs :</b>	<b>4</b>
<b>1.1.5. Habitat :</b>	<b>5</b>
<b>1.1.6. Les sérotypes d'<i>Escherichia coli</i> :</b>	<b>8</b>
<b>1.1.7. Les phylogroupes d'<i>E. coli</i> :</b>	<b>9</b>
<b>1.1.8. Les sérotypes d'<i>E. coli</i> :</b>	<b>10</b>
<b>1.1.9. Les pathovars de la bactérie <i>E. coli</i> :</b>	<b>12</b>
<b>1.2. La malnutrition :</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1. Définition :</b>	<b>13</b>
<b>1.2.2. Différentes formes de malnutrition :</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3. Classification de la malnutrition :</b>	<b>14</b>
<b>1.2.4. Les causes de la malnutrition :</b>	<b>15</b>
<b>1.2.5. Complications de la malnutrition :</b>	<b>16</b>
<b>1.2.6. Conséquences de la malnutrition :</b>	<b>16</b>
<b>1.2.7. Diarrhées et malnutrition :</b>	<b>17</b>
<b>1.2.8. Mesures et indices anthropométriques :</b>	<b>17</b>
<b>2. Méthodologie :</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Cadre d'étude :</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1. Commune de Dioro :</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2. Présentation du Centre de Santé Communautaire de Dioro :</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Type et période d'étude :</b>	<b>20</b>
<b>2.3. Echantillonnage :</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1. Eligibilité des participants :</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Considérations éthiques :</b>	<b>22</b>

2.5. Collecte des données anthropométriques : .....	22
2.6. Méthodes au laboratoire de Dioro :.....	22
2.6.1. Collecte des échantillons de selles :.....	22
2.6.2. Conservation des échantillons : .....	23
2.7. Méthodes au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) :.....	23
2.7.1. Protocole de culture des échantillons de selles : .....	24
2.7.2. Protocole des tests biochimiques : .....	27
2.7.3. Protocole d'extraction de l'ADN : .....	33
2.7.4. Génotypage des souches d' <i>E. coli</i> par PCR classique : .....	33
2.8. Gestion et analyse des données : .....	36
3. Résultats :.....	37
3.1. Données sur l'impact de la consommation du son de riz.....	37
3.2. Evolution de l'état nutritionnel des enfants au cours de l'étude : .....	38
3.3. Données sur les épisodes de diarrhée : .....	39
3.4. Caractéristiques phénotypiques : .....	40
3.5. Caractéristiques moléculaires :.....	41
4. Commentaires et discussion :.....	44
4.1. Méthodologie : .....	44
4.2. Evolution de l'état nutritionnel des enfants au cours de l'étude : .....	45
4.3. Données sur les épisodes de diarrhée : .....	45
4.4. Paramètres phénotypiques :.....	46
4.5. Le dysfonctionnement entérique : .....	46
4.6. Paramètres moléculaires : .....	47
4.6.1. Les gènes de virulence : .....	47
4.6.2. Les pathovars d' <i>E. coli</i> : .....	47
5. Conclusion et recommandations : .....	50
5.1. Conclusion : .....	50
5.2. Recommandations :.....	50
6. Références :.....	51
7. Annexes :.....	I
Serment de Galien .....	VI

# **Introduction**

## Introduction :

---

La mortalité infantile attribuable aux maladies infectieuses reste une préoccupation majeure de santé publique, bien que nous disposions actuellement de moyens de prévention et de traitement efficaces. Dans les pays en voie de développement où la couverture sanitaire est faible, les infections à *Escherichia coli* représentent une préoccupation à cause de leurs diversités, du nombre de patients touchés [1] et surtout l'accroissement de la résistance acquise des entérobactéries à certaines classes d'antibiotiques [2].

Locataire habituel de la flore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, la colonisation se fait dès les premières heures de la naissance et persiste dans le côlon durant toute la vie. Elle y représente près de 80% et assure, avec les autres composants de la microflore, une barrière de protection de la muqueuse [3]. La plupart des souches d'*E. coli* sont des agents non pathogènes de la flore intestinale de l'Homme et des animaux, cependant certaines souches ont acquis des facteurs de virulence qui leur permettent de provoquer d'importantes pathologies intestinales et extra-intestinales [4].

L'infection à *Escherichia coli* représente une cause importante de morbidité et de mortalité en pathologie infectieuse avec plus de 630 millions de cas par an dans le monde. Selon l'OMS, *Escherichia coli* est reconnu chez l'Homme comme la cause majeure de diarrhée bactérienne dans le monde [1] responsable de la mort de 525 000 enfants de moins de 5 ans chaque année [5]. *Escherichia coli* représente avec les salmonelles les principales sources d'infection bactérienne alimentaire. L'infection à *Escherichia coli* se singularise par sa possibilité de donner des tableaux cliniques très différents. Il est responsable de 60 à 80 % des infections urinaires, 40 % des méningites du nouveau-né (20 à 40 % de mortalité) et de 20 % des septicémies [6].

En Afrique, dans la plupart des pays, avec l'insuffisance d'équipement en laboratoire la mise en évidence de ces germes reste difficile. La prévalence était respectivement de 23,1 % au Nigeria ; 12 % en Ethiopie et 3,9 % au Sénégal [1].

Au Mali à Bamako, 121 souches d'*Escherichia coli* ont été isolées en 2008 dans le cadre d'une étude cas-témoin de diarrhée aiguë modérée à sévère chez des enfants de 0-59 mois [7]. Parmi les études les plus récentes faites au Mali sur les diarrhées et les infections urinaires on relève respectivement une fréquence d'*Escherichia coli* à 43,9 % et 45,3 % [1].

Dans ce travail nous allons porter notre attention sur les souches pathogènes responsables des troubles intestinaux afin de faire un lien avec la malnutrition.

La malnutrition est un trouble de la croissance et de l'évolution normale d'un enfant, ce trouble peut être le résultat d'une alimentation pauvre en nutriments. La malnutrition est un problème mondial dans lequel d'autres facteurs tels que les infections bactériennes jouent un rôle important en plus de l'insuffisance alimentaire [8].



Les causes de la malnutrition sont multiples, parmi lesquelles la diarrhée, qui peut être considérée comme cause et conséquence de la malnutrition. La diarrhée peut entraîner un retard de croissance chez l'enfant. La malnutrition augmente la durée et la fréquence diarrhéique, entretenant ainsi un cercle vicieux. L'infection a un effet négatif sur l'état nutritionnel en réduisant l'appétit (prise alimentaire) et l'absorption intestinale, en augmentant le catabolisme et la séquestration des micronutriments nécessaires à la synthèse des tissus et à la croissance. Par ailleurs, la malnutrition prédispose à l'infection du fait de ses effets négatifs sur les barrières de protection ordinaires constituées par la peau et les muqueuses contre les agents pathogènes d'une part, et sur la diminution des défenses immunitaires d'autre part [9].

Dans l'intestin, *E. coli* intervient dans la synthèse de vitamines. Cependant, certaines souches particulières d'*E. coli* possèdent un pouvoir pathogène important. Ainsi, la maladie de Hamburger est causée par une souche d'*E. coli*, le sérotype O157 : H7, qui a aussi été le principal microorganisme pathogène responsable de l'épidémie de Walkerton en 2000. L'espèce *E. coli* est une bactérie qui vit en commensalisme dans l'intestin des humains et des animaux à sang chaud. Elle est présente dans les matières fécales humaines à environ  $10^8$  UFC par gramme d'*E. coli* [10].

Beaucoup d'études ont été réalisées sur l'identification des souches pathogènes d'*E. coli*, toutefois peu d'études ont concerné, à notre connaissance l'identification des souches pathogènes d'*E. coli* dans les selles ayant un lien avec la malnutrition au Mali

### **Objectifs :**

- **Objectif général :**
  - Evaluer le danger lié à la présence des souches pathogènes d'*Escherichia coli* au niveau de la flore intestinale des enfants de 6 à 12 mois de la localité de Dioro.
- **Objectifs spécifiques :**
  - Identifier les enfants malnutris présents dans l'étude "Son de riz".
  - Détecter la présence des souches d'*Escherichia coli* dans les échantillons de selles par la culture sur géloses et les tests biochimiques.
  - Rechercher par la PCR les gènes et les souches pathogènes d'*Escherichia coli* responsables des pathologies intestinales.
  - Etablir un rapport entre le portage des souches pathogènes d'*E. coli* et la malnutrition.

# **Généralités**

## 1. Généralités :

---

### 1.1. *Escherichia coli* :

#### 1.1.1. Historique :

En 1885 en poursuivant ses travaux sur les selles de nourrissons, l'Allemand Theodor Escherich isola pour la première fois la bactérie *E. coli*, il décida en premier lieu de lui donner le nom de *Bacterium coli* commune. Ainsi le nom *Escherichia coli* est réellement retenu 1958 sur inscription du sous-comité *Enterobacteriaceae* du comité de nomenclature de l'association Internationale des Sociétés de Microbiologie [11]. Entre 1920 et 1930 plusieurs études cherchaient à identifier les différentes souches d'*E. coli* incriminées dans les pathologies entériques ; mais les résultats de ces études n'étaient pas exploitables jusqu'à l'élaboration d'un plan de serotypie par KAUFFMANN en 1940. Sur cette même lancée, dans les années 1950 plusieurs souches d'*E. coli* ont été incriminées dans des pathologies variées chez l'Homme et chez l'animal ; notamment les diarrhées simples et les infections systémiques sévères souvent même mortelles. Ces différentes souches ont été cataloguées [12].

#### 1.1.2. Taxonomie :

La taxonomie est l'ensemble des principes et théories qui permettent de classer et de valider le classement des micro-organismes ou taxons [13]. *Escherichia coli* est une espèce bactérienne du genre *Escherichia*, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, ordre des *Enterobactériales*, phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria* [1].

#### 1.1.3. Description d'*E. coli* :

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend à l'heure actuelle une centaine d'espèces dont les plus isolées en pathologie clinique appartiennent à 12 genres qui sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* [13]. Le genre *Escherichia* est constitué notamment par cinq autres espèces en plus d'*Escherichia coli* qui sont : *Escherichia abertii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermani*, *Escherichia velneris* et *Escherichia blattae*. Les caractéristiques biochimiques permettent de les identifier et chaque espèce est caractérisée par des caractéristiques biochimiques spécifiques.

Les bactéries du genre *Escherichia* sont des bacilles Gram négatifs, aérobies anaérobies facultatives, non halophiles et non sporulées [14].

La bactérie *E. coli* est un membre du groupe des coliformes, car elle est capable de croître à des températures relativement élevées (44.5 °C) [10]. *E. coli* est l'unique représentant du groupe des coliformes totaux présent uniquement dans les intestins des mammifères. Sa présence dans l'eau évoque généralement une contamination récente de celle-ci par des matières fécales et marque une présence susceptible d'agents pathogènes tels que les bactéries, les virus ou encore les parasites à l'origine des maladies [15]. La bactérie

*E. coli* est composée de bactéries commensales du tube digestif, de bactéries pathogènes [16] et de bactéries adaptées à l'environnement [17]. Les adhesines, les toxines, le système de captation du fer et les invasions sont des facteurs de virulence spécifiques retrouvés chez les souches pathogènes extra-intestinales et absentes chez les souches commensales et les souches pathogènes intestinales. Parmi les bactéries à coloration Gram négative, la bactérie *E. coli* est le plus souvent associée aux infections sanguines et urinaires [18].

La bactérie *E. coli* est retrouvée souvent au niveau de l'appareil génital féminin ou elle peut causer une colonisation vaginale ou une colonisation endocervicale ; encore responsable d'autres infections chez les femmes enceintes telles que les infections intra-amniotiques et puerpérales et des infections néonatales telles que la septicémie néonatale précoce et tardive.

Les infections urinaires et les septicémies néonatales constituent un problème majeur de santé publique et les souches extra-intestinales de la bactérie *E. coli* sont à l'origine de ces pathologies [19].

La bactérie *E. coli* est la bactérie la plus souvent isolée dans les laboratoires de microbiologie clinique, elle est très complexe et représente une cause majeure des contaminations de l'appareil urinaire. Elle est aussi capable d'infecter l'ensemble du système extra-intestinal provoquant des méningites, des infections de la peau, des myosites, des ostéomyélites, des épидидymo-orchites et peut même entraîner le syndrome de réponse inflammatoire systémique lors des infections graves de la bactérie *E. coli* [18].

L'espèce *Escherichia coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes pour l'Homme et diverses espèces animales sur base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques qui sont responsables de leur pouvoir de virulence. Ces souches pathogènes sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal (entérotoxinogènes, entéropathogènes, entérohémorragiques, et entéro-invasives) et en souches à tropisme extra-intestinal (uropathogènes et invasives). Les souches invasives provoquent des septicémies et/ou des bactériémies avec localisations dans différents organes (infections systémiques) [20].

#### **1.1.4. Identification d'*Escherichia coli* sur les milieux nutritifs :**

- Caractères morphologiques et culturels :

*Escherichia coli* ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 µ de long sur 0,4 à 0,6 µ de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémité arrondie, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe, non exigeant sur gélose ordinaire, il donne des colonies lisses, brillantes et homogènes. Sa température de croissance optimale est de 37 °C [13].

- Caractères biochimiques :

*E. coli* possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase. L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces galeries permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic

différentiel avec les autres bactéries de la même famille. Ces caractères sont regroupés dans le (tableau I) [13].

La plupart des souches fermentent le sorbitol en dehors du serotype O157 : H7. Ces caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des souches d'*E. coli* en dehors de certains mutants qui sont dépourvus de l'enzyme Glucuronidase. Ces caractéristiques distinctes permettent de rechercher et d'isoler les souches d'*E. coli* dans l'environnement et l'alimentation [17].

**Tableau I :** Caractères biochimiques d'*E. coli* [13]

Tests	Résultats
Glucose	+
Lactose	+
Hydrogène Sulfuré	-
Voges-Proskauer	-
Uréase	-
Indole	+
Citrate De Simmons	-
Orthonitrophenyl-β-D-Galactopyranoside	+
Citrate De Christensen	+
Arginine dihydrolase	+/-
Gélatinase	-
Malonate	-
Phényl-Alanine Désaminase	-
Lysine Décarboxylase	+
Ornithine Décarboxylase	+
Tryptophane Désaminase	-
Nitrate Réductase	+

- Caractères moléculaires :

Du point de vue moléculaire l'identification d'*Escherichia coli* dans les échantillons est basée sur la détection de certains gènes de virulence qui sont caractéristiques des différentes souches [16,21,22].

### 1.1.5. Habitat :

#### 1.1.5.1. Habitat primaire :

La bactérie *E. coli* appartient à la microflore commensale de l'Homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud (carnivores, omnivores, herbivores et

oiseaux) mais également des reptiles [23]. Le tractus digestif constitue son habitat primaire. La bactérie *E. coli* est présente principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations supérieures à  $10^6$  UFC (Unité Formant Colonie)/ g de contenu intestinal [24]. Elle demeure très souvent dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif qui constitue une niche écologique favorable pour son développement de par ses conditions de température, d'humidité et de disponibilité en nutriment [25].

#### **1.1.5.2. Habitat secondaire :**

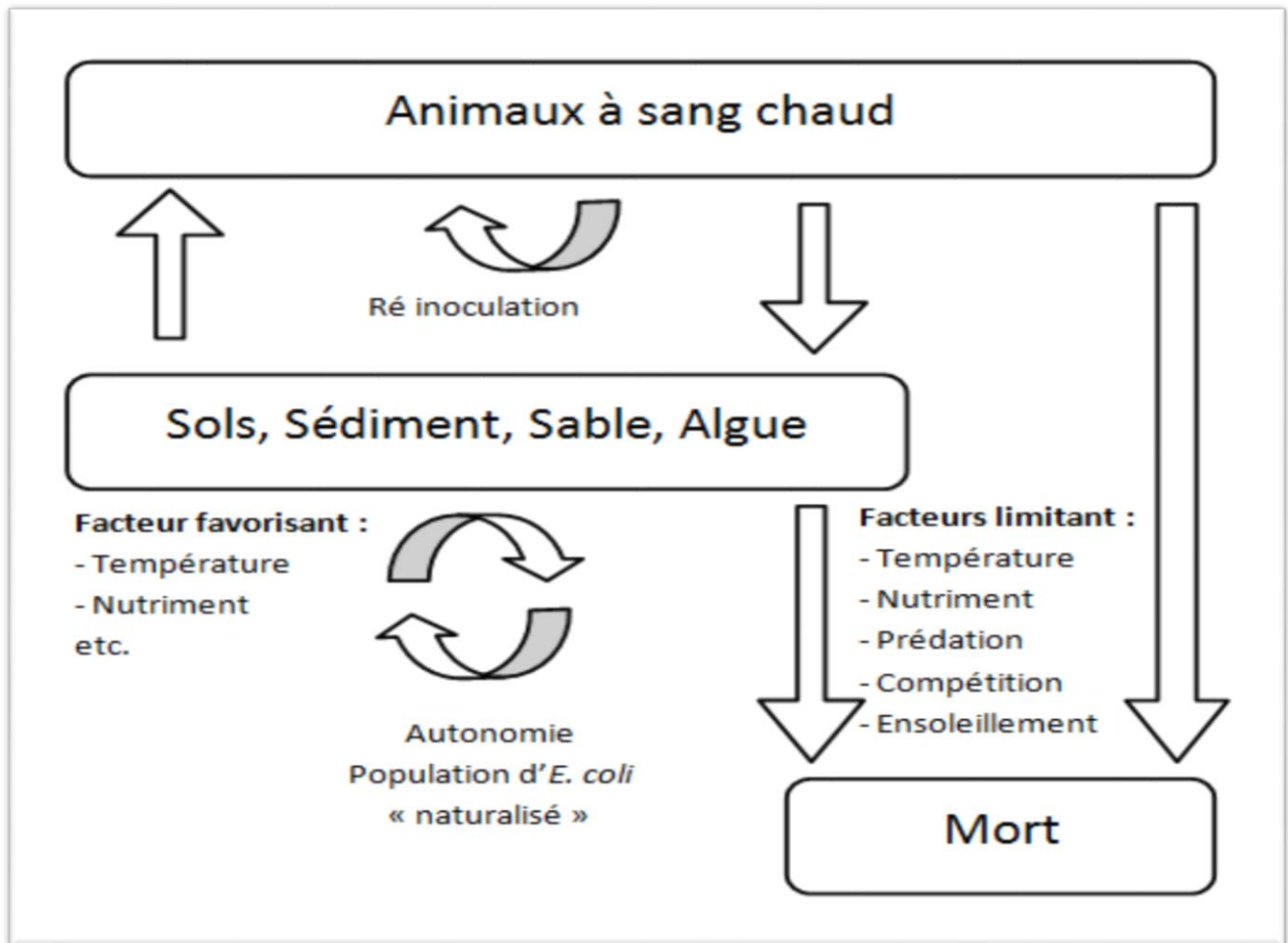
La bactérie *E. coli* est rejetée dans l'environnement à travers les fèces à une concentration d'environ  $10^8$  UFC/ g de fèces. Elle se retrouve dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les fumiers des animaux d'élevage ou par les déjections des animaux d'élevage ou des animaux sauvages [25].

L'environnement constitue l'habitat secondaire des *E. coli*. Il est contrairement à l'habitat primaire plutôt défavorable à leur survie [26]. Dans l'environnement, la bactérie *E. coli* est soumise à plusieurs types de pression, biotiques (prédation et compétition de flore) [27] et abiotiques (lumière, température, oligotrophie et salinité) [28].

**Tableau II : Principaux paramètres influençant la survie des bactéries dans l'environnement [17]**

Facteurs	Description
<b>Biotiques</b>	
Prédation	Bactéries entériques exogènes utilisées comme source de nutriment par les populations indigènes
Compétition	Compétition pour l'accès aux nutriments avec des populations indigènes.
Oligotrophie	Accessibilité aux sources en nutriment, sédimentation
<b>Abiotiques</b>	
Radiations solaires	Dépendantes des saisons et de la zone géographique. Niveau de pénétration des rayons dans l'eau conditionnée par les paramètres de diffusion et d'absorption du fluide
Température	Variation positive ou négative sur la survie de certains microorganismes Dépendante des saisons
Pluviométrie	Conditionne le taux d'humidité. Impacte les débits des rivières, conduit à la dilution des polluants drainés, participe à la remise en suspension de la matière organique.
Texture du sol	Sableux, vaseux, sec, humide, dur ou mou
pH	Milieu acide dû au compostage, à la fermentation ou aux traitements chimiques
Salinité	Responsable du choc osmotique, surtout observé en eau de mer

La population d'*E. coli* dans l'habitat secondaire se renouvelle par les apports de bactéries provenant de l'habitat primaire. Une minorité de la bactérie *E. coli* est capable de coloniser et de persister dans l'environnement hors de son hôte [29]. Cette population de la bactérie *E. coli* dite colonisatrice de l'environnement est qualifiée de population naturalisée [30] ou de coliformes du microbiote environnemental [29] (Figure 1).



**Figure 1 :** Cycle de vie d'*E. coli* [26]

Ce processus d'adaptation ou de naturalisation dans l'environnement secondaire a été observé au niveau des coliformes fécaux environnementaux avec l'identification de la bactérie *E. coli* ayant développée la capacité à produire une capsule [31] pour se protéger des agressions extérieures [32]. Pour résister à la pression exercée par le manque d'eau dans certains sols et au choc osmotique provoqué par la présence de sel en eau de mer, les souches d'*E. coli* ont développée une capacité à produire des solutés organiques de type tréhalose pour résister à la dessiccation et à la salinité [33].

#### 1.1.6. Les sérotypes d'*Escherichia coli* :

KAUFFMANN a établi les bases du schéma d'identification par sérotypie correspondant à une combinaison de certains antigènes de surface que l'on peut mettre en évidence. La mise au point et l'utilisation de cette technique ont permis d'identifier les différentes souches pathogènes d'*E. coli*. Trois (03) antigènes de surface ont pu être étudié et retenus : les antigènes somatiques « O », capsulaires « K » et flagellaires « H » [11].



Les souches pathogènes d'*E. coli* ont une taille supérieure à celle des souches commensales non pathogènes [11]. Cette différence s'observe au niveau du génome, le génome des souches pathogènes est caractérisé par la délétion d'un certain nombre de gènes et l'addition d'autres régions supplémentaires (traits accessoires) [34]. Les souches pathogènes d'*E. coli* possèdent environ 20 % d'information génétique supplémentaire, acquise extérieurement au cours de transferts horizontaux d'ADN [11].

- Antigènes somatiques O : (lipopolysaccharide)

L'antigène somatique O détermine le sérotype. Les antigènes somatiques sont composés de lipopolysaccharides (LPS) présents sur la paroi bactérienne. Certaines molécules de LPS permettent à la bactérie de se protéger contre l'action lytique du complément, la fixation des anticorps et la phagocytose [35].

- Antigènes flagellaires H : (protéine)

L'antigène flagellaire H est de nature protéique et entre en jeu dans la structure du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. La diversité des antigènes H est due aux différents types de flagelline et il en existe plus de 56 [35].

- Antigènes de surface K : (polysaccharide)

Encore appelés antigènes capsulaires ou d'enveloppe ou encore antigène Vi chez *Salmonella*, ce sont des polysides acides qui ont été initialement subdivisés en trois types à savoir : les antigènes A, B, et L. Ils masquent l'Ag O, empêchant ainsi le sérotypage lorsqu'ils sont présents [36].

Les souches les plus pathogènes possèdent l'antigène K1 [15,37].

La biologie moléculaire montre l'existence de plus de 174 sérogroupes Ag O, 80 sérogroupes Ag K et 56 sérogroupes Ag H différents avec plus de 9 000 combinaisons possibles [38].

Malgré la diversité des génomes de la bactérie *E. coli* et les nombreuses variations dues aux phénomènes d'acquisition et de délétion de gènes, plusieurs approches moléculaires ont permis d'élaborer une signature génétique permettant de classer l'espèce *E. coli* indépendamment des notions d'*E. coli* commensal [39] et pathogène [40].

### 1.1.7. Les phylogroupes d'*E. coli* :

Un phylogroupe se définit par l'étude phylogénétique qui s'intéresse à la classification des individus en groupes selon l'identification de critères moléculaires communs [41]. La technique de génotypage comme le ribotypage affiné par Multi-Locus Sequence Typing (MLST) et le séquençage génomique de nombreuses souches d'*E. coli* mettent en évidence la présence de quatre (04) groupes phylogénétiques majeurs (A, B1, B2 et D) et trois groupes mineurs (C, E et F) [42]. Cette classification ne cesse de s'affiner avec l'apparition de nouveaux sous-phylogroupes (A0, A1, B22, B23, D1, D2) [43] et de clades ou branches (clades I à V ; Tableau III) [44].

**Tableau III :** Mise en évidence des phylogroupes d'*E. coli* en fonction des combinaisons de gènes recherchés [44]

Phylogroupes	Méthodes	Gènes cibles	Références
A, B1, B2 et D	PCR	<i>chuAa</i> , <i>yjaAb</i> fragment d'ADN TSPE4.C2	[45]
A, B1, B2, D, E et F	PCR	<i>chuAa</i> , <i>yjaAb</i> fragment d'ADN TSPE4.C2c, <i>arpAd</i>	[44]
<b>Clades I à V</b>			
A0, A1, B22, B23, D1, D2	PCR	<i>chuAa</i> , <i>yjaAb</i> fragment d'ADN TSPE4.C2c	[25]
A, B1, B2, C, E et D	Typage moléculaire /Séquençage	<i>trpAe</i> , <i>trpBe</i> , <i>pabBf</i> , <i>putPg</i> , <i>icdh</i> , <i>polBi</i>	[46]

<sup>a</sup> codant une protéine impliquée dans le transport de l'hème, <sup>b</sup> codant une protéine de fonction inconnue, <sup>c</sup> codant une lipase estérase, <sup>d</sup> codant une protéine régulatrice, <sup>e</sup> gène de l'opéron tryptophane, <sup>f</sup> codant une paminobenzoate synthase, <sup>g</sup> codant une proline perméase, <sup>h</sup> codant une isocitrate déshydrogénase, <sup>i</sup> codant la polymérase Pol II.

La prévalence et la répartition de la bactérie *E. coli* appartenant aux phylogroupes principaux A, B1, B2 et D chez les mammifères sont conditionnées par les caractéristiques de l'hôte (alimentation, morphologie du tube digestif et masse corporelle) et par les facteurs environnementaux (climat et géolocalisation) [47].

Une étude en 2004 a rapporté que les souches d'*E. coli* commensales semblent faire partie préférentiellement du phylogroupe A. Les souches virulentes d'*E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (Ex-PEC) semblent majoritairement associées au phylogroupe B2 et en minorité au phylogroupe D. Les souches responsables de diarrhées chroniques légères telles que les EPEC ne semblent pas être classées spécifiquement parmi un phylogroupe bien que certaines études les associent préférentiellement au phylogroupe B1 [48,49]. Les souches d'*E. coli* pathogènes productrices de toxines comme les EHEC se répartissent préférentiellement entre les phylogroupes A et B1, ce qui est également soutenu par deux études récentes [50,51]. Toutefois certaines de ces souches telles que celles du sérotype O157 :H7 appartiennent au phylogroupe E [52].

### 1.1.8. Les sérotypotypes d'*E. coli* :

Pour les *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines, en considérant leur niveau de pathogénicité chez l'Homme, les sérotypotypes ont pu être classés en sérotypotypes basés sur leur fréquence d'association avec des infections humaines et leurs implications dans des épidémies ou de graves complications. En 2003,

Karmali et al. ont proposé de classer les sérotypes majeurs en cinq (05) séropathotypes, de A à E ; soit du séropathotype A correspondant aux sérotypes les plus virulents, tel que l'O157 :H7, au séropathotype E représentant l'ensemble des sérotypes d'*E. coli* non associés à des maladies humaines (Tableau IV) [53,54].

**Tableau IV** : Classification des sérotypes d'*E. coli* en séropathotypes

Séropathotypes	Sérotypes	Fréquence (association avec une infection)	Implication (responsable D'épidémie)	Association avec SHU et CH
A	O157 : H7, O157 : HNM	Importante	Souvent	+
B	O26 : H11, O103 :H2, O111 : HNM, O121 : H19, O145 : HNM	Modérée	Peu souvent	+
C	O5 : HNM, O91 :H21, O104 :H21, O113 :H21, O121 : HNM, O165 :H25	Faible	Rare	+
D	O7 :H4, O69 :H11, O103 :H25, O113 :H4, O117 :H7, O119 :H25, O132 : HNM, O146 :H21, O171 :H2, O172 : HNM, O174 : H8	Faible	Rare	-
E	O6 : H34, O8 : H19, O39 : H49, O46 : H38, O76 : H7, O84 : HNM, O88 : H25, O98 : H25, O113 : HNM, O136 : HNM, O143 :H31, O156 : HNM, O163 : HNM	Non impliqué	Non impliqué	-

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

CH : Colites Hémorragiques

En 2015 une étude a suggéré de réviser cette classification en se basant sur le phénotype ou le typage moléculaire pour définir les groupes [55].

### 1.1.9. Les pathovars de la bactérie *E. coli* :

Le vétérinaire danois Carl Oluf Jensen se basant sur le concept de “pathotype” affirme que la bactérie *E. coli* est composée de groupes hétérogènes composés de souches provoquant des pathologies et de souches tout à fait inoffensives [11]. Les souches d'*Escherichia coli* sont présentes dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, dont l'Homme où elles jouent de façon générale le rôle de bactéries commensales. Néanmoins, certaines souches ayant acquis un arsenal de facteurs de virulence peuvent provoquer des infections intestinales et extra-intestinales [36].

Les souches de la bactérie *E. coli* à l'origine de maladies intestinales se multiplient dans l'intestin de leurs hôtes. Ces souches pathogènes sont subdivisées en six (06) pathotypes majeurs selon le type de maladie engendré et les facteurs de virulence associés. La majorité des pathogènes intestinaux de la bactérie *E. coli* appartient aux groupes phylogénétiques A/B1/E et sont reconnus comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique.

- *Escherichia coli* Entérotoxinogènes (ETEC) :

Les ETEC sont à l'origine d'épisodes de diarrhée aqueuse, modérée à sévère, peu fébriles, associés à des nausées et à des crampes abdominales. Dans les pays en voie de développement, les ETEC sont la cause majeure de cas de diarrhée aqueuse aiguë chez les enfants de moins de 5 ans et de « diarrhée du voyageur » ou « turista ». Des souches ETEC sont également importantes dans les fermes, les porcelets en post-sevrage sont fortement susceptibles à l'infection.

Les ETEC appartiennent aux sérogroupes : O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 et O173 [56].

- *Escherichia coli* Entéroinvasives (EIEC) :

Les EIEC sont responsables de syndrome dysentérique caractérisé par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnées d'une diarrhée aqueuse évoluant rapidement vers une dysenterie (diarrhée contenant du sang et du mucus) [5].

- *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC) :

Les DAEC sont un groupe hétérogène qui produit une adhésion diffuse sur les cellules HeLa et Hep-2. Ils peuvent coloniser le tractus urinaire et être à l'origine d'infection urinaire récurrente chez l'adulte [56].

- *Escherichia coli* Entéroaggrégatives (EaggEC, ou EAEC) :

Considérées comme des pathogènes émergents, les EAEC sont la deuxième cause de diarrhée des voyageurs après ETEC dans les pays développés et les pays en voie de développement. Les EAEC sont également reconnues comme une cause de diarrhée endémique et épidémique dans le monde entier. La diarrhée provoquée par les EAEC est souvent aqueuse, mais elle peut être accompagnée de mucus ou de sang [56]. Les EAEC sont responsables des diarrhées du nourrisson et des jeunes enfants dans les pays en développement. Ces souches sont associées à des cas de diarrhée persistante [5].

- *Escherichia coli* entéro-pathogènes (EPEC) :

Les EPEC sont responsables de cas de diarrhée sévère chez les enfants dans les pays en voie de développement. Par contre, dans les pays industrialisés, l'incidence des infections dues aux EPEC a fortement diminué. Les sérogroupes des souches EPEC les plus fréquemment associés à la diarrhée chez l'Homme sont O111, O128, O86, O55, O125, O127 [56].

- Les souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) :

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des bactéries pathogènes et zoonotiques qui se retrouvent dans l'eau et parfois dans les aliments. Elles sont responsables de diarrhée, de colite hémorragique et de syndrome urémique hémolytique chez l'Homme mais peu ou pas de maladie perceptible chez les animaux considérés comme des réservoirs. *Escherichia coli* O157 :H7, le sérotype le plus souvent incriminé des EHEC a été isolé en 1982 lors d'une épidémie de colites hémorragiques à la suite de consommation de viande pas assez cuite dans des restaurants « fast food » [56].

## **1.2. La malnutrition :**

### **1.2.1. Définition :**

Selon l'OMS « la malnutrition est un état pathologique résultant de l'insuffisance ou des excès relatifs ou absolus d'un ou de plusieurs nutriments essentiels, que cet état se manifeste cliniquement, où qu'il ne soit pas décelable que par les analyses biologiques, anthropométriques ou physiologiques ». Cette définition exclut les troubles nutritionnels liés à des erreurs de métabolisme ou à une malabsorption [8].

La malnutrition infantile est influencée par des facteurs multidimensionnels qui peuvent être groupés en trois : les facteurs maternels, les facteurs alimentaires et socio-environnementaux et les facteurs économiques [57].

### **1.2.2. Différentes formes de malnutrition :**

Il y a 4 formes de malnutrition [58] :

- La sous-alimentation : état pathologique résultant de la consommation d'une quantité insuffisante de nourriture pendant une période prolongée.
- La suralimentation : état pathologique résultant de la consommation excessive de nourriture et par suite, d'un excès de calories pendant une période prolongée.
- Les déséquilibres nutritionnels : état pathologique résultant d'une disproportion entre les nutriments essentiels, avec ou sans carence absolue de l'un d'entre eux.
- Les carences spécifiques : état pathologique résultant de la privation totale ou partielle d'un nutriment déterminé (vitamine ou oligo-élément).

### **1.2.3. Classification de la malnutrition :**

#### **1.2.3.1. Malnutrition aiguë ou émaciation :**

La malnutrition aiguë ou émaciation reflète la situation nutritionnelle d'un enfant à un moment donné et est due à un apport alimentaire insuffisant ou à des problèmes d'absorption. Il en résulte soit un indice poids pour taille inférieur à la moyenne, soit la présence d'œdèmes nutritionnels bilatéraux, soit les deux. Il existe deux différents degrés de malnutrition aiguë : la malnutrition aiguë modérée peut dégénérer en malnutrition aiguë sévère et la malnutrition aiguë sévère est liée à un risque de mortalité très élevé si elle n'est pas traitée immédiatement [15].

- Les aspects cliniques de la malnutrition aiguë :
  - Le Marasme :

Le marasme est caractérisé par un état d'amaigrissement extrême, une fonte musculaire massive, un faciès de vieillard. L'enfant de vue a perdu du poids de façon évidente et à ses côtes et son zygomatique visible ainsi que ses articulations très apparentes. Il ne lui reste pratiquement plus de graisse sous-cutanée. La peau fine et atrophique, avec de nombreux plis, semble trop grande pour lui [59].

- Le Kwashiorkor :

L'enfant présente des œdèmes, sa peau est sèche et squameuse, ses cheveux se décolorent et tombent, perte de poids qui peut être masqué par l'œdème, manque d'appétit, nervosité, pleures incessantes, diarrhée [8]. L'hépatomégalie et les lésions cutanées telles que les dermatoses sont également caractéristiques de ce syndrome clinique [59].

- Le Kwashiorkor-marasmique (forme mixte) :

L'enfant présente à la fois les caractéristiques cliniques du kwashiorkor et du marasme mais à des degrés variables. C'est une forme clinique qui est rarement rencontrée [60].

#### **1.2.3.2. La Malnutrition chronique ou retard de croissance :**

La malnutrition chronique se détecte lorsque l'on évalue le rapport taille/âge et se caractérise par des enfants rabougris (trop petits pour leur âge). La prévalence est importante entre 24 et 36 mois. La malnutrition chronique se développe lentement, en lien avec une situation de pauvreté structurelle, notamment quand l'alimentation n'est pas équilibrée [15].

#### **1.2.3.3. La Malnutrition globale ou insuffisance pondérale :**

La malnutrition globale ou insuffisance pondérale est mesurée par l'indice poids/âge et se caractérise par un faible poids chez l'enfant par rapport à son âge. Cependant, cela peut aussi refléter une maladie récente (diarrhée). Selon l'Unicef France, un enfant de moins de cinq ans sur 4, soit 129 millions d'enfants dans le monde en développement, souffre d'insuffisance pondérale (poids très faible) [15].

#### 1.2.4. Les causes de la malnutrition :

Comprendre les causes de la malnutrition permet de mesurer l'ampleur du problème, facilite la prise en charge et la lutte contre cette pathologie.

- Causes immédiates :

Ces causes sont principalement l'inadéquation de la ration alimentaire et la maladie. Leur interaction tend à créer un cercle vicieux (figure 2) rendant l'enfant vulnérable aux maladies, il tombe malade et de ce fait l'état de la malnutrition s'aggrave.

Les enfants fragilisés sur le plan nutritionnel sont les premiers affectés, la malnutrition et le déficit en vitamine A favorisent la survenue d'une rougeole (très contagieuse) qui peut être mortelle en cas de complications [15].

- Infections bactériennes :

Les infections bactériennes sont fréquentes chez les enfants malnutris, souvent par plusieurs germes. Les infections des voies respiratoires inférieures sont particulièrement courantes [61].

- Infections parasitaires :

La diarrhée est également l'un des nombreux signes d'une infection intestinale parasitaire.

Les parasites les plus fréquemment en cause sont : *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium*. Lorsque les défenses immunitaires sont diminuées, les diarrhées sont fréquentes et sévères chez les mal nourris. Les enfants bien nourris restent des porteurs sains de parasites. La guérison de la diarrhée ne s'obtient qu'après traitement de la malnutrition et de la déficience immunitaire de l'enfant [9].

Le couple malnutrition-paludisme engendre un cercle vicieux (figure 2) qui a un énorme impact sur la morbidité et la mortalité des groupes de population les plus vulnérables [62].

- Infections à VIH et SIDA :

Dans certains pays, jusqu'à la moitié des enfants gravement atteints de malnutrition ont le SIDA. Le traitement de la malnutrition chez les enfants infectés par le VIH ou vivant avec le SIDA est le même que chez les enfants qui sont séronégatifs [61].

- Causes sous-jacentes :

Ces causes se classent en trois groupes aboutissant aux causes immédiates et sont principalement : l'insécurité alimentaire des ménages, l'insuffisance des services de santé et d'assainissement et la mauvaise qualité des soins apportés aux enfants et aux femmes [63]. La malnutrition peut être la conséquence d'anomalies congénitales non reconnues, de maladies enzymatiques, d'affections malignes, de réactions d'hypersensibilité immédiate ou d'autres atteintes des organes principaux. L'examen d'un enfant qui ne répond pas au traitement doit inclure la recherche d'une éventuelle maladie sous-jacente grave [61].

- Causes fondamentales :

Il s'agit des causes liées aux facteurs politiques, juridiques, culturelles, des conséquences de la pauvreté, du sous-développement et évidemment le manque de ressources naturelles.

### **1.2.5. Complications de la malnutrition :**

Les complications de la malnutrition constituent en effet les principales causes de mortalité dans les services de récupération nutritionnelle, car elles peuvent entraîner le décès de l'enfant.

Ces complications sont :

- La diarrhée :

Les maladies diarrhéiques constituent un problème majeur de santé publique dans les pays en développement. 20 % de décès d'enfants de 0 à 4 ans est lié à la diarrhée dans certains pays [64]. La déshydratation et la dénutrition sont des complications redoutables et constituent souvent des motifs d'hospitalisation [65].

- Les infections :

L'absence de réponse au traitement est souvent imputable à des infections non reconnues, les plus fréquentes étant les suivantes : pneumonie, infection urinaire, otite moyenne, tuberculose, paludisme, dengue, hépatite virale B ou infection à VIH [61]. Chaque fois que les barrières immunitaires sont franchies, divers processus biochimiques, métaboliques et hormonaux produisent un effet délétère sur l'état nutritionnel en modifiant l'équilibre entre apports et besoins. L'anorexie provoque une diminution des ingesta et la malabsorption réduit encore la quantité de nutriments absorbés. Parallèlement, les besoins sont augmentés suite à la synthèse accrue de protéines spécifiques (inflammatoires, immunoglobulines etc.) et à l'hyperthermie qui augmente le métabolisme basal [66].

- Autres complications :

Vomissement sévère ; pneumonie ; hypoglycémie ; lésions cutanées ouvertes ; hypothermie < 35,5 °C (rectal) ou < 35 °C (axillaire) ; fièvre > 39 °C (rectal) ou >38,5 °C (axillaire) ; pâleur extrême (anémie sévère) ; faible, apathique ou inconscient ; convulsions ; carence clinique en vitamine A [67].

### **1.2.6. Conséquences de la malnutrition :**

- La hausse de la mortalité infantile et maternelle :

Chaque année la malnutrition contribue directement ou indirectement au décès d'environ 6 millions d'enfants, les enfants hypotrophiques et ceux qui présentent une insuffisance pondérale grave courent entre deux et huit fois plus de risque de mourir dans l'année suivante que les enfants de poids normal [15].

L'anémie ferriprive est à l'origine de 20% des cas de mortalité maternelle en Asie et en Afrique, car elle abaisse la résistance à la maladie et accroît le risque d'hémorragie lors de l'accouchement.

Chaque année dans le monde en développement, sur près de 12 millions de décès qui surviennent parmi les enfants de moins de cinq ans, la malnutrition est responsable directement ou indirectement de 55 % de ces



décès. La carence en vitamine A, touchant 100 millions d'enfants dans le monde, est une cause de cécité. Mais on s'aperçoit de plus en plus aussi que, même modérée, cette carence a une action négative sur le système immunitaire, diminuant ainsi, la résistance à la diarrhée (qui emporte 2,2 millions d'enfants chaque année) et à la rougeole (qui emporte près d'un million par an) [63].

Les effets les plus dévastateurs de la malnutrition se produisent avant la naissance (lorsque le fœtus ne peut pas se développer correctement) et pendant les premières années de la vie d'un enfant, lorsque son développement physique et mental est freiné [68].

### 1.2.7. Diarrhées et malnutrition :

La maladie est un des déterminants immédiats de l'état nutritionnel. Les mauvaises pratiques d'hygiène alimentaire augmentent le risque d'infections d'origine alimentaire comme la diarrhée qui à son tour détériore l'état nutritionnel entraînant un affaiblissement du système immunitaire. Les infections d'origine alimentaire se répandent plus rapidement avec des conséquences graves chez les personnes mal-nourries. Il se crée un cercle vicieux (figure 2) malnutrition-maladie avec un risque élevé de décès [37]. Dans les pays en voie de développement, les diarrhées bactériennes restent un problème majeur de santé publique et une cause importante de morbidité et de mortalité infantiles dans les pays du tiers monde [64,65].

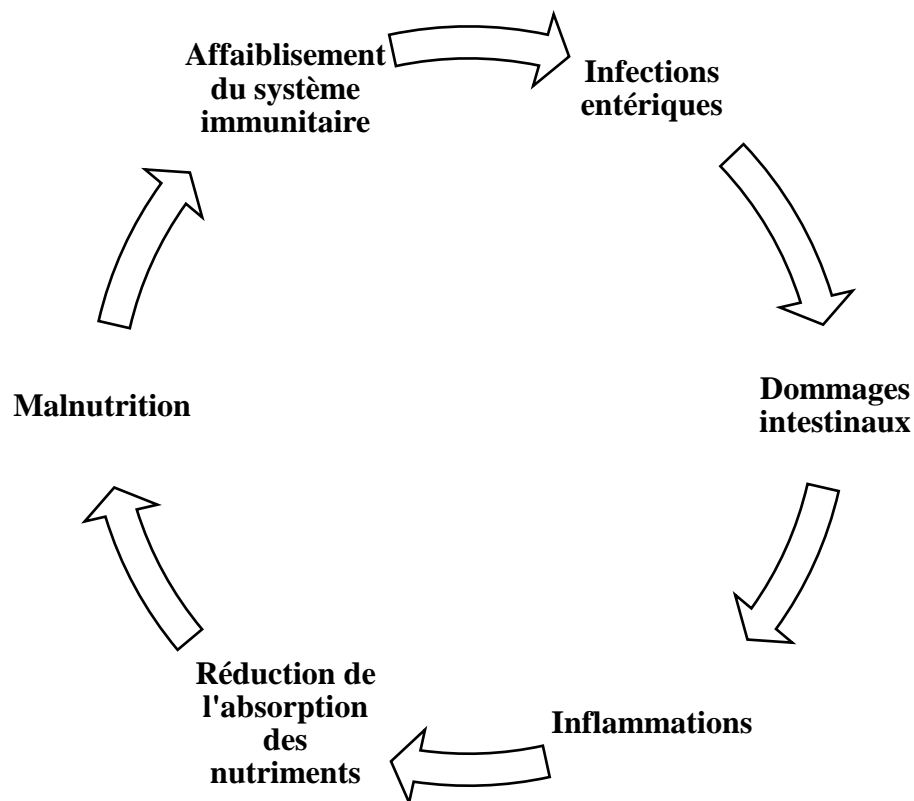


Figure 2 : Cercle vicieux [69]

### 1.2.8. Mesures et indices anthropométriques [15] :

- Mesures :

Les mesures anthropométriques sont utilisées pour évaluer l'état nutritionnel des individus et des groupes de population mais aussi comme critères d'éligibilité pour les programmes d'aide alimentaire. Les mesures anthropométriques communes sont la taille, le poids et le périmètre brachial. Les données nécessaires sont :

- Poids en kilogrammes à l'aide d'une balance :
- Taille en centimètres à l'aide d'une toise :

Prise en position debout si l'enfant a 24 mois ou plus,

Prise en position couchée si l'enfant a moins de 24 mois.

- Périmètre brachial :

Le périmètre brachial est utilisé pour évaluer l'état nutritionnel des enfants âgés de 6 à 59 mois et des adultes (femmes enceintes et allaitant), en mesurant le tour du bras (le bras gauche) à mi-hauteur entre l'épaule et le coude à l'aide d'un mètre ruban ou d'une bandelette colorée (bande de Shakir).

- Indices anthropométriques :
  - Rapport poids/taille :

Il exprime le poids d'un enfant en fonction de sa taille. Cet indice évoque une baisse récente de l'apport alimentaire et met en évidence la maigreur ou malnutrition aiguë.

- Rapport poids/âge :

L'indice poids/âge exprime le poids d'un enfant en fonction de son âge. Cet indice indique un régime alimentaire inadapté (temporaire ou habituel). Il est utilisé pour la mise en évidence d'une malnutrition globale (insuffisance pondérale).

- Rapport taille/âge :

L'indice taille/âge exprime la taille d'un enfant en fonction de son âge. Une petite taille par rapport à l'âge indique donc que le régime alimentaire habituel n'est pas adéquat. Il est utilisé pour la mise en évidence d'un retard de croissance ou malnutrition chronique.

# **Méthodologie**

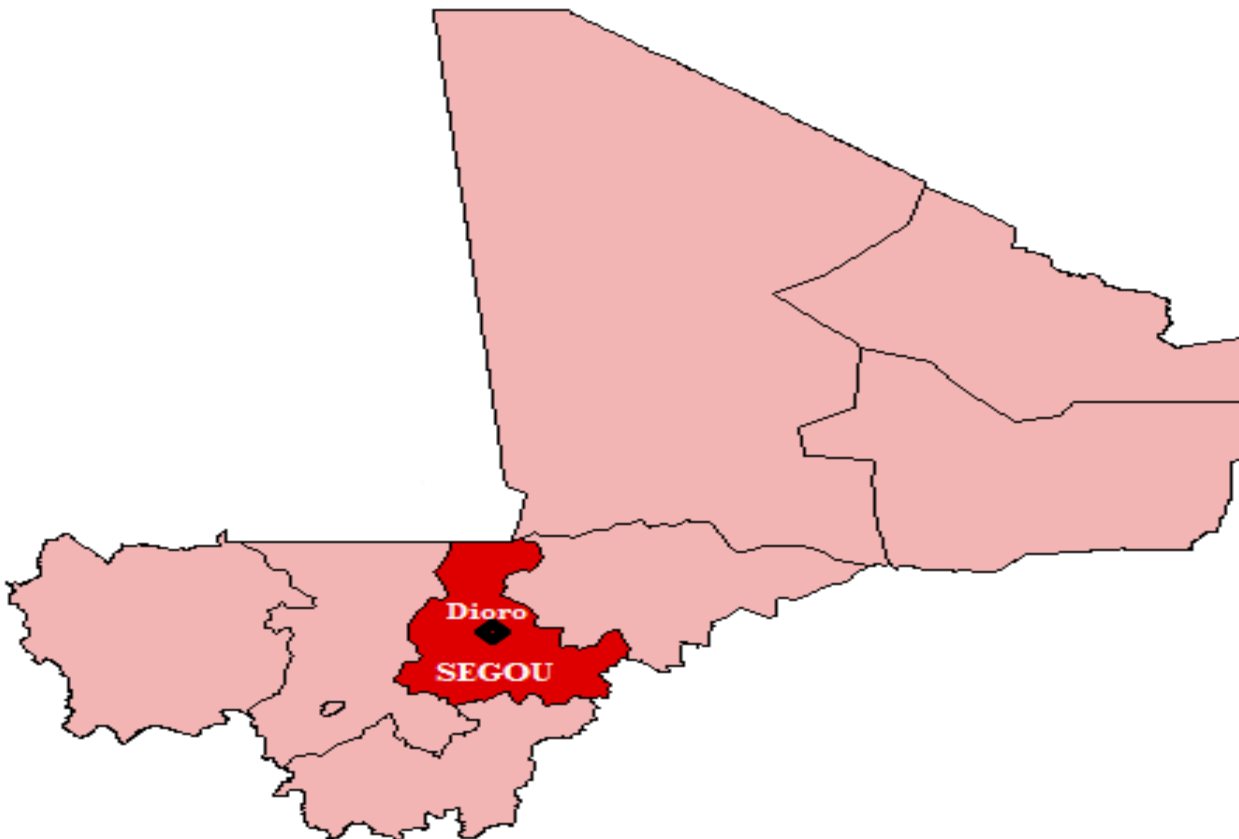
## 2. Méthodologie :

### 2.1. Cadre d'étude :

#### 2.1.1. Commune de Dioro :

Nous avons réalisé cette étude dans la commune rurale de Dioro qui relève du district sanitaire de Markala dans le Cercle de Ségou (Région de Ségou). Le choix de Dioro porte sur sa riziculture par excellence et l'existence d'une unité de laboratoire équipée au cours du projet "International Center Of Excellence For Malaria Research" (ICEMR) par l'équipe du LBMA.

La commune de Dioro (Région de Segou) est située à 240 kilomètres de Bamako, la capitale du Mali. Elle a une population de 47.836 habitants (50,5% sont des femmes) répartie entre 20 000 ménages dans la ville de Dioro.



**Figure 3 :** Situation géographique de la commune rurale de Dioro au Mali [70]

#### 2.1.2. Présentation du Centre de Santé Communautaire de Dioro

Le centre de santé communautaire (CSCoM) de Dioro est une structure sanitaire de niveau I de la pyramide sanitaire du Mali. Ce centre est situé sur la route principale Ségou-Dioro du côté-Est de la Mairie. Il est dirigé par un Directeur Technique de Centre (DTC).

- Organisation générale du CSCoM de Dioro :

Le centre dispose de :

- Un dispensaire comprenant : une (1) salle d'attente, un (1) bureau du médecin, un (1) bureau du major , une (1) salle d'injection, une (1) salle de pansement, un premier dépôt de médicaments, une (1) toilette, un (1) laboratoire d'analyse biomédicale, une (1) unité de laboratoire de biologie moléculaire appliquée, qui a pour objectif d'appliquer le programme d'ICEMR (International Center Of Excellence For Malaria Research) et un (1) magasin,
- Une (1) maternité (nouvelle maternité) (1 infirmière obstétricienne et deux matrones),
- Un (1) bloc d'observation comprenant : deux (2) salles d'observation, le bureau du président de l'ASACO, le bureau du trésorier de l'ASACO et Un (1) deuxième dépôt de médicaments pour la garde,
- Un bloc (1) (ancienne maternité) comprenant : une salle d'échographie, le bureau de la mutuelle, une salle d'enregistrement de naissance et un dortoir,
- Un hangar pour la vaccination, un magasin pour la maternité et le dortoir pour le gardien.
- Les activités du CSCom de Dioro
  - Les consultations sont effectuées du lundi au vendredi de 08h à 13h.
  - Les gardes sont assurées après les heures de services.
  - Il existe au niveau du dispensaire un site de prise en charge globale du VIH.
  - Un centre de diagnostic de la tuberculose (CDT).
  - Une unité chargée du dépistage et de la prise en charge des enfants présentant la malnutrition.
  - Au niveau de la maternité il existe un site de protection de la transmission mère-enfant du VIH.
  - Le gérant du dépôt de médicaments est chargé de la dispensation des antirétroviraux, la gestion des tickets de consultation et la vente des médicaments.

## **2.2. Type et période d'étude :**

Il s'agit d'une étude cas-témoins réalisée à partir des données et des échantillons de l'étude cohorte prospective "Rice Bran" faite entre novembre 2015 et mai 2016 à Dioro.

## **2.3. Echantillonnage :**

- Etude son de riz (Rice bran) : La population d'étude a concerné les nourrissons de six (6) mois choisis à partir du registre de la maternité du CSCom de Dioro et dont les parents étaient consentants pour participer à l'étude. Ces nourrissons ont été randomisés selon le sexe en 2 bras : le bras intervention (son de riz + vitamine A, n = 25), le bras témoin (vitamine A seulement, n = 25).
- Etude actuelle :

- Nous avons utilisé les données de l'étude "Rice Bran" pour évaluer l'impact de la consommation du son de riz sur la survenue de la diarrhée. Considérant que la diarrhée pourrait être aussi une cause de malnutrition.
- Au cours du suivi des enfants de l'étude "Rice Bran", les données anthropométriques étaient collectées. Nous avons constitué les deux groupes de cette présente étude en utilisant les z-scores (poids/taille) déterminés à travers les données anthropométriques. Le groupe malnutri a été constitué de la manière suivante ; au cours du suivi, une fois qu'un enfant avait un z-scores  $< -2$  ( malnutrition modérée), il rentrait dans le groupe malnutrition. Ce processus a été appliqué sur les 6 mois du suivi (z-scores  $< -2$  ; groupe malnutri) et le reste a composé le groupe contrôle (z-scores  $\geq -2$  ; enfants "sains").

Au total 50 nourrissons (n = 50) ont participé à cette étude.

### **2.3.1. Eligibilité des participants :**

- Critères d'inclusion :

Ont été inclus dans cette étude les nourrissons ayant :

- Six (6) mois au début de l'enrôlement ;
- Un taux d'hémoglobine supérieur ou égal à 7 g/dl ;
- Une absence des parasites intestinaux et / ou du parasite du paludisme ;
- Des familles acceptant de les nourrir pendant six (6) mois avec une dose quotidienne de son de riz stabilisé à la chaleur fournie par les investigateurs ;
- Pas fait l'objet d'hospitalisation antérieure ;
- Pas eu de vitamine A en capsule.

- Critères de non inclusion :

N'ont pas été inclus dans cette étude, les nourrissons ayant :

- Eu un traitement antipaludique ou prophylactique dans un délai de deux (2) semaines avant la participation ;
- Une maladie actuelle ;
- Une maladie chronique entraînant un état connu d'immuno-compromission ou un antécédent d'immunodépression ;
- Un taux d'hémoglobine inférieur à 7 g/dl ;
- Des parasites intestinaux ;
- Des parasites du paludisme.

## **2.4. Considérations éthiques :**

Le protocole de recherche de cette étude a été soumis à l'accord du comité d'éthique de l'INRSP, (Ministère de la Santé, Mali).

L'autorisation des responsables du CSCoM de Dioro et les responsables du projet « Son de riz » a été obtenue pour la réalisation de cette étude.

L'assentiment des parents de chaque enfant inclus dans l'étude a été obtenu.

L'anonymat et la confidentialité des familles et leurs enfants ont été respectés conformément aux règles d'éthique médicale et à la législation sur la recherche biomédicale et scientifique.

## **2.5. Collecte des données anthropométriques :**

Il y a eu deux (2) mesures du périmètre brachial, au début et à la fin de l'intervention, sept (7) séries de mesures de la taille et du poids pour tous les participants, une mesure à chaque mois de l'étude, incluant celle faite à l'enrôlement. Ces mesures nous ont permis de déterminer les z-scores indiquant le profil général de la croissance. Les z-scores caractérisent la croissance de l'Homme après la naissance et décrivent les changements rapides en fonction de l'âge. La taille et le poids ont été mesurés durant les épisodes de diarrhées. Nous avons utilisé la table poids/taille de l'OMS pour déterminer le z-score [71].

## **2.6. Méthodes au laboratoire de Dioro :**

- Collecte des échantillons de sang :
  - Diagnostic du paludisme par la méthode de la goutte épaisse.
  - Estimation du taux d'hémoglobine à l'aide de l'appareil HemoCue®.

### **2.6.1. Collecte des échantillons de selles :**

Il y a eu sept 7 séries de collectes d'échantillons de selles : à l'inclusion dans l'étude et lors des visites mensuelles (une visite mensuelle) pour chaque participant durant les six (6) mois du suivi. Un échantillon de selles diarrhéiques était aussi collecté durant le suivi et en cas d'épisodes de diarrhée.

#### **2.6.1.1. Diagnostic des parasitoses intestinales dans les selles :**

L'examen direct des selles et la technique de Kato-Katz ont été réalisés. Ces méthodes permettent de mettre en évidence les différents stades des parasites intestinaux.

A la visite d'inclusion, l'examen direct et la technique de Kato-Katz étaient utilisés pour identifier les infections helminthiques et d'autres parasites tels que *Entamoeba histolytica* et *Giardia intestinalis*. Ces nourrissons ont été traités à chaque fois que les examens mettaient en évidence des parasites intestinaux et n'ont pas été inclus dans l'étude.

- Examen direct des échantillons de selles :

L'examen direct a permis de repérer les formes végétatives, vivantes, mobiles et kystes de protozoaires, les œufs et les larves d'helminthes.

- Examen des échantillons de selles par la technique de Kato-Katz :

La méthode de Kato-Katz a permis de mettre en évidence les œufs d'helminthes les oocystes sporocystes de coccidies. Elle est une technique qualitative et semi quantitative donc sans valeur pour les kystes et les formes végétatives d'amibes, les flagellés, et les larves d'helminthes.

#### **Mode opératoire :**

- Tamiser les selles, et prélever une portion du tamisât à l'aide d'une spatule ;
- Placer le calibre au milieu d'une lame porte-objet ;
- Remplir le trou du calibre (contenance de 40 mg ou 25 mg) avec le tamisât et raser la surface de la selle avec l'applicateur ;
- Soulever le calibre, et déposer sur la selle, le rectangle de cellophane déjà découpé ;
- Retourner la lame sur la paille, puis appuyer sur les deux extrémités de la préparation de manière à étaler régulièrement la selle ;

La préparation est conservée 15-30 min dans la chambre humide à la température du laboratoire avant d'être examinée au microscope 10 x et / ou 40 x pour la recherche des œufs de schistosomes.

Tous les œufs contenus dans la préparation sont comptés et rapportés en nombre d'œufs par gramme de selles ; soit en multipliant le nombre d'œufs comptés par 25 ou par 40 pour les puits de 2,5 mg.

#### **2.6.2. Conservation des échantillons :**

Lors des visites mensuelles et en cas de diarrhée, des selles fraîchement récoltées étaient diluées 20 fois et homogénéisées dans un tampon phosphate de potassium (pH 7,2 ; 0,1 M) contenant 20 % de glycérol (vol / vol). Le mélange était distribué dans des cryotubes de 10 ml et immédiatement transféré dans une bonbonne d'azote liquide avant d'être transféré au LBMA à Bamako pour être conservé dans un congélateur -80 °C jusqu'à utilisation. Des échantillons de selles fraîchement émises ont été collectés dans de tube eppendorf et gardés à 4 °C.

#### **2.7. Méthodes au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) :**

Au LBMA à Bamako, les échantillons de selles ont été ensemencés sur les géloses de Mac Conkey et Hektoen pour l'isolement d'*E. coli*. Les colonies pures ont été soumises aux tests biochimiques pour l'identification d'*E. coli*.

Les colonies pures ont été conservées dans un bouillon nutritif et gardées à (-80 °C).

Les colonies soupçonnées d'*E. coli* ont été soumises à la PCR pour l'identification des pathovars à travers l'utilisation d'amorces spécifiques.



### **2.7.1. Protocole de culture des échantillons de selles : [22]**

Les échantillons de selles ont été ensemencés sur les géloses de Mac Conkey et Hektoen afin d'isoler les souches d'*E. coli*.

#### **2.7.1.1. Gélose de Mac Conkey :**

##### **Principes :**

L'inhibition des microorganismes à Gram positif est due à la présence de sels biliaries et de cristal violet. Ce colorant inhibe principalement le développement des entérocoques et des staphylocoques. La gélose Mac Conkey est un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries.

La fermentation du lactose en acide est révélée en présence du rouge neutre par la formation de colonies roses ou rouges. Les microorganismes lactose-négatif présentent des colonies incolores.

##### **Préparation du milieu :**

- Mettre en suspension 50 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée ;
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution ;
- Répartir en tubes ou en flacons ;
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

##### **Mode opératoire :**

- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C ;
- Couler en boîtes de Pétri stériles ;
- Laisser solidifier sur une surface froide ;
- Ensemencer en stries l'inoculum à la surface des boîtes afin d'obtenir des colonies isolées ;
- Incuber à 37 °C de 18 à 24 heures ;

##### **Lecture :**

Les colonies lactose-positif présentent une coloration rouge et sont entourées d'un halo de sels biliaries précipités. Les colonies lactose-négatif sont incolores.



**Figure 4 :** Image d'une gélose Mac Conkey (Image Laboratoire)

#### **2.7.1.2. Gélose d'Hektoen : (Annexe II)**

La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries pathogènes à partir des prélèvements biologiques d'origine animale, des eaux, des produits laitiers et des autres produits alimentaires. Elle évite l'envahissement par les *Proteus*.

- Principes :

L'inhibition de la flore à Gram positif est due à la présence de sels biliaires qui peuvent également inhiber légèrement la croissance de quelques souches de microorganismes à Gram négatif.

Le milieu contient trois glucides : lactose, saccharose et salicine. La forte concentration en lactose favorise la visualisation des entérobactéries en évitant le problème des fermentations tardives. Les autres glucides ont été introduits afin d'assurer une différenciation plus performante et de réduire la toxicité engendrée par les indicateurs colorés.

En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition du sulfure de fer au centre des colonies.

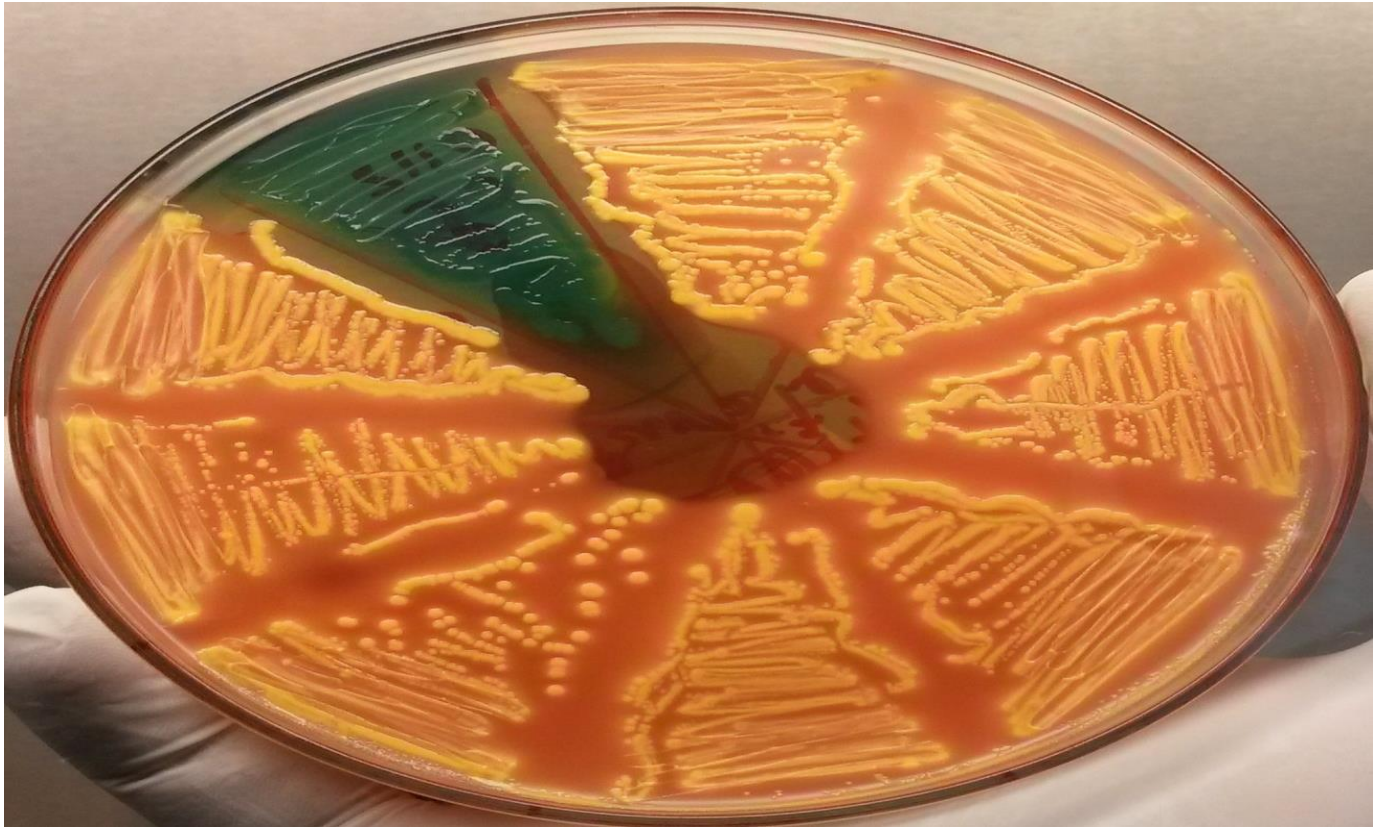
Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en jaune orangé les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose-négatif.

- Préparation du milieu :
  - Mettre en suspension 75,1 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée ;
  - Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution ;
  - Ne pas autoclaver ;
  - Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C ;
  - Couler en boîtes de Pétri stériles ;
  - Laisser solidifier sur une surface froide.
- Mode opératoire :
  - A la surface des boîtes ainsi préparées ramener préalablement à température ambiante, ensemer en stries l'inoculum ;
  - Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

**NB** : l'incubation peut être poursuivie jusqu'à 48 heures.

- Lectures :

Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des trois (03) glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon", les autres donnant des colonies bleues ou vertes. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent, avec le citrate ferrique, des colonies à centre noir. L'aspect des microorganismes est le suivant :



**Figure 5 :** Image d'une gélose Hektoen (Image Laboratoire)

**Tableau V :** Interprétation des caractères morphologiques des cultures sur la gélose Hektoen [3]

Caractéristiques	Microorganismes
Colonies jaune saumon	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i>
Colonies jaune saumon à centre noir	<i>Proteus vulgaris</i>
Colonies vertes à centre noir	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i>
Colonie vertes ou bleuâtres	<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Proteus morganii</i> , <i>Proteus rettgeri</i>
Petites colonies bleues ou brunâtres	<i>Pseudomonas</i> (oxydase positive)

### 2.7.2. Protocole des tests biochimiques :

Les échantillons ayant donnés des caractéristiques de culture identiques aux souches d'*E. coli* ont été soumis à une série de tests biochimiques pour l'identification des souches d'*E. coli* avant de procéder à la PCR.

#### 2.7.2.1. Gélose de Kligler Hajna : (Annexe III)

- Principes :

La fermentation du lactose et du glucose, permettant la différenciation des entérobactéries, se traduit par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH).

Les microorganismes qui fermentent le glucose, mais pas le lactose (salmonelles ou shigelles), produisent initialement une pente jaune due à l'acidification obtenue par fermentation du glucose présent en faible quantité. Lorsque le glucose est complètement utilisé dans l'environnement aérobie de la pente, la réaction s'alcalinise par oxydation des acides produits, phénomène aboutissant à l'apparition d'une coloration rouge en surface. Cette alcalinisation n'apparaît pas en profondeur dans le culot, où la coloration se maintient au jaune. Les germes fermentant le lactose et le glucose font virer au jaune la pente et le culot par une production importante d'acide, ce qui suffit à maintenir un pH acide en surface. Les microorganismes ne fermentant aucun des deux glucides ne modifient pas la couleur du milieu.

La production d'H<sub>2</sub>S se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

La production de gaz (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), résultant des fermentations sucrées, se traduit par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

- Préparation :
  - Mettre en suspension 58 g de milieu déshydraté dans 01 litre d'eau distillée ou déminéralisée ;
  - Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution ;
  - Répartir en tubes ;
  - Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes ;
  - Incliner les tubes de manière à obtenir un culot de 03 cm de hauteur et une pente oblique.

**NB :** Une liquéfaction partielle de l'agar entraînera inévitablement une altération significative de la consistance du gel du milieu solidifié, après stérilisation et refroidissement.

**NB :** Il est recommandé, lorsque le milieu n'est pas utilisé dans les 8 jours qui suivent sa préparation, de le régénérer au bain-marie bouillant et de le solidifier à nouveau en bonne position.

- Mode opératoire :
  - A partir d'une colonie suspecte prélevée sur un milieu d'isolement sélectif, ensemercer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées ;
  - Il est nécessaire d'utiliser des cultures pures prélevées au centre de colonies bien isolées, sinon les réactions croisées rendent l'identification impossible à réaliser ;
  - Incuber à 37 °C pendant 24 heures, capsules desserrées, de manière à favoriser les échanges gazeux.
- Lecture :

Le milieu de Kligler Hajna fournit quatre (04) renseignements principaux :

- Fermentation du glucose :

Culot rouge : glucose non fermenté

Culot jaune : glucose fermenté

- Fermentation du lactose :

Pente inclinée rouge : lactose non fermenté

Pente inclinée jaune : lactose fermenté

- Production de gaz :

Apparition de bulles de gaz dans le culot

- Formation de H<sub>2</sub>S :

Production d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

### 2.7.2.2. Citrate de Simmons : (Annexe IV)

C'est un milieu gélosé utilisé pour l'identification des entérobactéries par l'utilisation du citrate comme seule source de carbone.

- Préparation :

Verser 23,3 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 15 minutes à 121 °C à l'autoclave.

- Intérêt :

La gélose citrate de Simmons est recommandée par Ewing et Edwards pour différencier les entérobactéries d'après l'utilisation ou non du citrate comme seule source de carbone. Ce milieu est en fait une forme solide du milieu au citrate de Koser qui, à l'origine, avait l'inconvénient de donner une fausse apparence de croissance avec un inoculum riche. L'addition du bleu de bromothymol dans le milieu l'a nettement amélioré.

- Utilisation :

Ce milieu peut être utilisé aussi bien en tube gélosé incliné qu'en boîte de Pétri. Dans les deux cas, ensemercer légèrement la surface du milieu par stries et pour les tubes en pente jusque dans le culot. Il est recommandé d'incuber 48 heures à 37 °C. L'utilisation du citrate entraîne une alcalinisation (+) avec un virage du milieu du vert au bleu brillant. Dans le cas contraire, il n'y a pas de changement de couleur. *Escherichia coli* (y compris les sérotypes responsables d'entérites infantiles), *Shigella*, *Yersinia* et *Edwardsiella* ne poussent pas sur ce milieu. *Serratia*, la plupart des *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Providentia*, (sauf *Morganella morganii* et *Klebsiella rhinoscleromatis*) utilisent le citrate et donnent une teinte bleue caractéristique. La gélose citratée de Simmons peut servir à différencier les *Salmonella* Enteritidis qui sont citrate (+) de *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Pullorum et Gallinarum qui sont citrate (-).

- Conservation :

Conserver le milieu déshydraté à 10–25 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon. Conserver le milieu prêt à l'emploi à 2–8 °C.

### **2.7.2.3. MR-VP Medium (Glucose Phosphate Broth) : (Annexe VI)**

Le test du Rouge de méthyle et le test de Voges-Proskauer sont utilisés pour la différenciation des entérobactéries.

- Préparation :

Suspendre 17 grammes dans 1000 ml d'eau distillée. Chauffer si nécessaire pour dissoudre complètement. Distribuer dans des tubes à essai un volume de 10 ml et stériliser par autoclavage à (121°C) pendant 15 minutes.

- Principe et interprétation :

Le Rouge de méthyle et le test de Voges-Proskauer sont deux (2) tests utilisés dans l'identification biochimique des espèces bactériennes. Les deux tests sont basés sur la détection des produits de dégradation spécifique dans le métabolisme des glucides. Toutes les entérobactéries par définition fermentent le glucose. Dans le bouillon MR-VP, après 18-24 heures d'incubation, la fermentation conduit à des sous-produits métaboliques acides. Par conséquent, d'abord toutes les bactéries entériques donneront une réaction MR positive. Cependant, après une incubation supplémentaire, requis par la procédure du test (2-5 jours), les bactéries MR-positifs continuent à produire les acides, ayant pour résultat un pH faible (acide) qui surmonte le système tampon phosphate et maintient un environnement acide dans le milieu (pH 4,2 ou moins). Les bactéries MR-négatifs métabolisent en outre les produits de fermentation initiale par décarboxylation pour produire le methylcarbinol d'acétyle neutre (acétoïne), ce qui entraîne une diminution de l'acidité du milieu et augmente le pH vers la neutralité (pH de 6,0 ou plus). En présence d'oxygène atmosphérique et en milieu alcalin, les produits terminaux neutres, l'acétoïne et 2, 3-butanediol, sont oxydés en diacétyle, qui réagissent avec la créatine pour produire une couleur rouge. Le test du rouge de méthyle (MR) est effectué après 05 jours d'incubation à 30 °C.

Pour le test de Voges-Proskauer (VP) les cultures sont mises en incubation à 30° C pendant 24-48 heures. Les tests MR et VP ne devraient pas être considérés comme le seul moyen de différencier *E. coli* du *Klebsiella* et d'*Enterobacter*.

### **2.7.2.4. Le milieu urée-indole : (Annexe V)**

- Intérêt :

Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants :

- Présence d'une uréase ;
- Présence d'une tryptophanase ;
- Présence d'un tryptophane désaminase (TDA).

Ce milieu est utilisé pour l'identification des entérobactéries (bacille gram -, oxydase -)

- Principe :

- Recherche de l'uréase :

L'uréase dégrade l'urée selon la réaction suivante :  $\text{Urée} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$ .

Les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  entraînent une forte alcalinisation du milieu qui se révélera par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rouge).

- Recherche de la production d'indole (mise en évidence de la tryptophanase) :

La tryptophanase hydrolyse le tryptophane selon la réaction :

$\text{Tryptophane} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{indole} + \text{acide pyruvique} + \text{NH}_3$ .

L'indole forme un complexe coloré en rouge en présence d'un réactif : le réactif de Kovacs.

- Recherche du tryptophane désaminase :

La TDA dégrade le tryptophane selon la réaction :

$\text{Tryptophane} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acide indole pyruvique} + \text{NH}_3$ .

L'acide indole pyruvique forme un précipité marron foncé en présence d'un réactif : le chlorure de fer en solution acide.

- Ensemencement

Ensemencer quelques gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu solide ;

Incubation 24 heures à 37 °C.

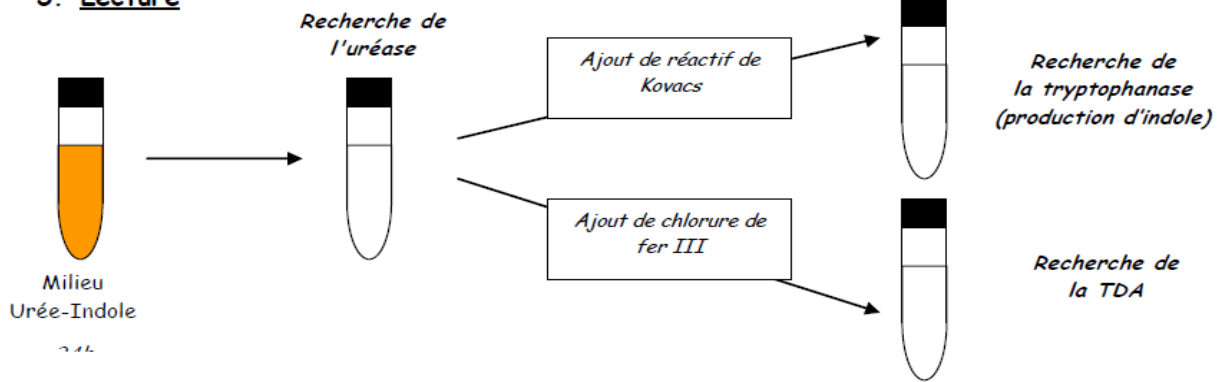
**Mode opératoire :**

- Répartir le milieu entre les tubes à hémolyse stériles, à raison de 1 ml par tube ;
- Réaliser une suspension du germe à tester dans 1 ml d'eau déminéralisée stérile ;
- Ensemencer 01 goutte de cette suspension dans 2 tubes à hémolyse de milieu urée indole ;
- Incuber les tubes à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures ;

- Lecture



## 5. Lecture




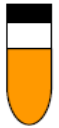
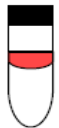


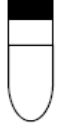
Caractère recherché	Observation	Interprétation	Conclusion
<b>Uréase</b> (lecture après 24 heures d'incubation)	 Milieu rouge	Alcalinisation du milieu due à la dégradation de l'urée	La bactérie possède l'uréase Elle est dite <b>uréase +</b>
	 Milieu orangé (inchangé)	Pas d'alcalinisation du milieu	La bactérie ne possède pas l'uréase Elle est dite <b>uréase -</b>
Après avoir effectué la lecture, séparer le milieu urée indole en deux (prélever une partie du milieu et le transvaser dans un tube à hémolyse propre) puis réaliser les tests suivants :			
<b>1<sup>er</sup> tube : recherche de la production d'indole :</b> <i>Ajouter 3 gouttes du réactif de Kovacs et effectuer la lecture sans agiter le milieu</i>			
<b>Indole</b>	 Apparition d'un anneau rouge	Présence d'indole. Le tryptophane a donc été hydrolysé	La bactérie a produit de l'indole Elle est dite <b>indole +</b>
	 L'anneau reste orangé	Absence d'indole	La bactérie n'a pas produit d'indole Elle est dite <b>indole -</b>
<b>2<sup>ème</sup> tube : recherche de la tryptophane désaminase (TDA) :</b> <i>Ajouter 3 gouttes du réactif (= chlorure de fer III en solution acide) et effectuer la lecture</i>			
<b>TDA</b>	 Coloration marron foncé	Présence d'acide indole pyruvique. Le tryptophane a été désaminé.	La bactérie possède la tryptophane désaminase. Elle est dite <b>TDA +</b>
	 Coloration inchangé	Absence d'acide indole pyruvique	La bactérie ne possède pas la tryptophane désaminase. Elle est dite <b>TDA -</b>

Figure 6 : Lecture et interprétation des tests biochimiques [5]

### 2.7.3. Protocole d'extraction de l'ADN :

L'ADN des colonies de bactéries suspectées d'*E. coli* a été extrait par choc thermique.

Des colonies étaient suspendues dans 100 µl d'eau distillée stérile et incubées à 100 °C pendant 10 minutes dans le bain-marie (Isotemp 2100, Fisher Scientific). Après le choc thermique, la suspension est centrifugée (Eppendorf 5417C) à 2500 g à 25 °C pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite recueilli dans un nouveau tube stérile Eppendorf de 1,5 ml et gardé à -20°C en vue des études moléculaires.

La qualité de l'ADN extrait et sa concentration ont été déterminées par la lecture de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre (Eppendorf AG, Allemagne).

#### 2.7.3.1. Quantification de l'ADN : [15]

Elle a été faite par spectrophotométrie.

Le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminants des préparations absorbent aussi à 260 nm, mais avec un maximum d'absorption qui se situe vers 280 nm à cause des acides aminés aromatiques. Le rapport  $R = A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  constitue alors un moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la pureté d'ADN par les protéines ou par les RNA.

- $R = A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  ;
- ADN pure :  $1,8 < R < 2$  ;
- ADN contaminé par les protéines :  $R < 1,7$  ;
- ADN contaminé par les ARN :  $R > 2$ .

Pour calculer la concentration d'ADN : 1 unité DO 260 nm correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN double brin.

Donc la concentration de l'ADN en µg/ml = facteur de dilution × DO 260 × 50µg/ml.

L'ADN a été dosé avec le spectrophotomètre (Eppendorf AG, Allemagne).

### 2.7.4. Géotypage des souches d'*E. coli* par PCR classique : [22]

Nous avons utilisé la technique de la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction PCR) pour le géotypage des souches d'*E. coli* obtenues par les tests biochimiques.

Nous avons utilisé comme contrôle positif de l'ADN obtenus à partir de certaines souches isolées au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée de Bamako (LBMA). Il s'agit des gènes *pCVD432*, *vt1* et *vt2*.

#### 2.7.4.1. Polymerase Chain Reaction (PCR) :

C'est une technique de biologie moléculaire basée sur la sélection puis l'amplification d'un gène spécifique de la bactérie à partir d'amorces spécifiques à ce gène. La PCR permet l'amplification exponentielle d'une région spécifique d'un acide nucléique donné par l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, d'amorces et de quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs).

Elle a l'avantage de pouvoir détecter une souche spécifique de la bactérie par des gènes spécifiques ou après digestion du produit de PCR avec des enzymes de restriction spécifiques.

L'ensemble est soumis à une série de cycles de température afin d'obtenir une quantité suffisante de la séquence d'ADN désirée.

- Amplification des gènes de virulence par la PCR multiplexe :

Les amorces spécifiques utilisées ont correspondu à l'identification de cinq (5) souches d'*E. coli* pathogènes responsables des diarrhées, il s'est agi des souches EAEC, EHEC, EIEC, EPEC et ETEC.

L'ADN extrait des échantillons de selles a été soumis à une PCR multiplexe avec les amorces spécifiques (Tableau VI) pour la détection des marqueurs de virulence suivant :

- *pCVD* (séquence de nucléotide d'*EcoRI-PstI*, fragment d'ADN de *pCVD432* d'EAEC) ;
- *eaeA* (gène structurale pour l'intimine d'EHEC et EPEC) ;
- *vt1* et/ou *vt2* (verotoxines 1 et 2 d'EHEC) ;
- *ial* (plasmide d'invasion trouvé chez EIEC et chez *Shigella*) ;
- *bfpA* (gène de structure d'EPEC) ;
- *eltB* et/ou *estA* (enterotoxines LT et ST d'ETEC).

- Composition du mélange réactionnel pour la PCR multiplexe :

La PCR a été conduite suivant le protocole modifié d'une étude menée par Vilchez et al. au Nicaragua en 2009 [22]. Les réactifs de la compagnie Invitrogen (USA) ont été utilisés. Un volume total de 25 µl a été utilisé avec 3 µl de la suspension d'ADN, 1 X de Buffer (sans Mg<sup>2+</sup>) 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de dinucleotides triphosphates (dNTPs), 0,4 µM de chaque amorce (Tableau VI) des gènes de virulence et 0,1 U de Taq polymérase.

- Amplification par la PCR monoplexe des gènes de virulence pour la confirmation :

En raison d'une similitude entre les tailles des bandes, il a été parfois difficile de distinguer les bandes individuelles ; par conséquent, il a été nécessaire d'effectuer une PCR monoplexe avec chaque amorce spécifique sur ces mêmes échantillons pour confirmer la détection de la souche suspectée.

- Programme de l'amplification par PCR (monoplexe et multiplexe) :

La PCR a été faite à l'aide du thermocycleur (PTC-200 de MJ Research, Inc, USA) en utilisant le programme suivant : une dénaturation initiale des brins d'ADN à 94 °C pour 5 minutes suivie d'un cycle incluant une dénaturation (94 °C, 30 secondes), un appariement des amorces (60 °C ; 1 minute) et une extension de la copie du brin d'ADN (72 °C ; 75 secondes), ce cycle était répété 40 fois . Enfin, les amplicons pouvaient être conservés dans le thermocycleur (PTC-200 de MJ Research, Inc, USA) à 4 °C jusqu'au moment de l'utilisation.

**Tableau VI : Liste des amorces utilisées pour l'identification des souches d'*E. coli* [22].**

Souches	Gènes cibles	Amorces	Séquences d'amorces	Taille (bp)
ETEC	<i>eltB</i>	LT	5'TCTCTATGTGCATACGGAGC <sup>3'</sup>	322
			5'CCATACTGATTGCCGCAAT <sup>3'</sup>	
	<i>estA</i>	ST	5'GTCAAACCAGTA(G/A)GTCTTCAAAA <sup>3'</sup>	147
			5'CCCGGTACA(G/A)GAGGATTACAACA <sup>3'</sup>	
EHEC	<i>vt1</i>	VT1	5'GAAGAGTCCGTGGGATTAC <sup>3'</sup>	130
			5'AGCGATGCAGCTATTAATAA <sup>3'</sup>	
	<i>vt2</i>	VT2	5'ACCGTTTTTCAGATTTT(G/A)CACATA <sup>3'</sup>	298
			5'TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT <sup>3'</sup>	
EPEC	<i>eaeA</i>	eae	5'CACACGAATAAACTGACTAAAATG <sup>3'</sup>	376
			5'AAAACGCTGACCCGCACCTAAAT <sup>3'</sup>	
	<i>bfpA</i>	bfpA	5'TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT <sup>3'</sup>	367
			5'TTTTGTGTTGTATCTTTGTAA <sup>3'</sup>	
EIEC	<i>ial</i>	SHIG	5'CTGGTAGGTATGGTGAGG <sup>3'</sup>	320
			5'CCAGGCCAACAATTATTTC <sup>3'</sup>	
EAEC	<i>pCVD432</i>	EA	5'CTGGCGAAAGACTGTATCAT <sup>3'</sup>	630
			5'AAATGTATAGAAATCCGCTGTT <sup>3'</sup>	

### 3.7.4.2. Procédures de la technique d'électrophorèse et de visualisation des bandes amplifiées :

La séparation des produits de la PCR a été réalisée sur un gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium. Les marqueurs de tailles moléculaires 100 bp (paires de bases) ont été utilisés. La migration a été faite sur une tension de 150 volts pendant 35 minutes. Les bandes étaient visualisées et photographiées sous UV® light transilluminator. La taille des bandes a été calculée à l'aide du logiciel Doc-ItLS Analysis Software.

- Technique d'électrophorèse

Nous avons procédé comme suit :

- Préparer une solution d'agarose à 1.5 % dans du TBE 0,5 X au four micro-onde pendant environ 2 mn à 3 mn ;
- Ajouter 30µl de bromure d'éthidium, mélanger puis mouler dans un bac monté d'un peigne sur une surface plane bien ajustée, laisser le gel se polymériser pendant environ 30mn à 1 heure , retirer le peigne ;

- Placer le gel dans le bac à électrophorèse submergé d'une solution de TBE 0,5 X. Loger les échantillons à tester et les contrôles en mélangeant 10 µl d'ADN et 2 µl de Dye dans les puits du peigne en commençant par le marqueur ;
  - Faire migrer de la cathode (-) vers l'anode (+) pendant environ 35 mn à 150 volts et à 2 ampères
  - Révéler les bandes en scannant le gel à l'aide de l'appareil photo UVP relié à l'ordinateur, sauvegarder le fichier et analyser les paramètres moléculaires.
- Visualisation des bandes amplifiées :

Les bandes rendues fluorescentes par le bromure d'éthidium étaient photographiées sous la lumière Ultra-violette du transilluminateur, ensuite l'image du gel était téléchargée à l'aide de la camera du système UVP relié à l'ordinateur. La présence d'une bande de taille spécifique sur le gel d'agarose traduit la présence de l'une des cinq souches pathogènes d'*E. coli*. Les bandes identifiées pour chaque paire d'amorces étaient ensuite enregistrées sur le tableur Excel sur Windows 2000. Le programme UVP nous permet d'estimer la taille de chacun des fragments amplifiés afin de confirmer avec précision la souche pathogène d'*E. coli* correspondante.

#### 2.7.4.3. Détermination de la taille des bandes :

Elle se faisait par l'introduction d'un marqueur de taille (ou de poids moléculaire) comme standard qui migre en même temps que les échantillons à tester.

#### 2.8. Gestion et analyse des données :

La base de données et le calendrier du suivi des enfants enrôlés ont été gérés avec Microsoft Excel et Word (2010).

L'analyse des données a été faite l'aide des logiciels IBM SPSS Statistics 20, EPI INFO 7, Xlstat (2018) et Microsoft Excel (2013).

Nous avons utilisé le test de  $\text{Khi}^2$  et l'Odds Ratio.

**Tableau VII :** Interprétation de l'Odds Ratio

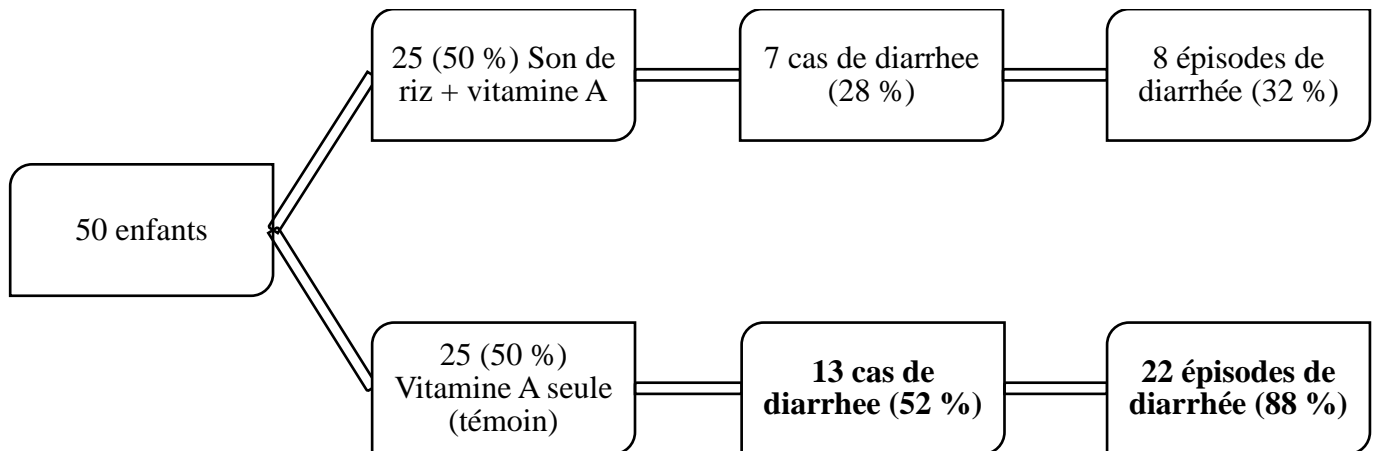
Cas	Témoins	Odds Ratio
<ul style="list-style-type: none"> <li>● OR = 1, l'évènement est indépendant du groupe</li> <li>● OR &gt; 1, l'évènement est plus fréquent chez les cas</li> <li>● OR &lt; 1, l'évènement est plus fréquent chez les témoins</li> <li>● P &lt; 0,05, différence statistiquement significative</li> </ul>		

# Résultats

### 3. Résultats :

#### 3.1. Données sur l'impact de la consommation du son de riz

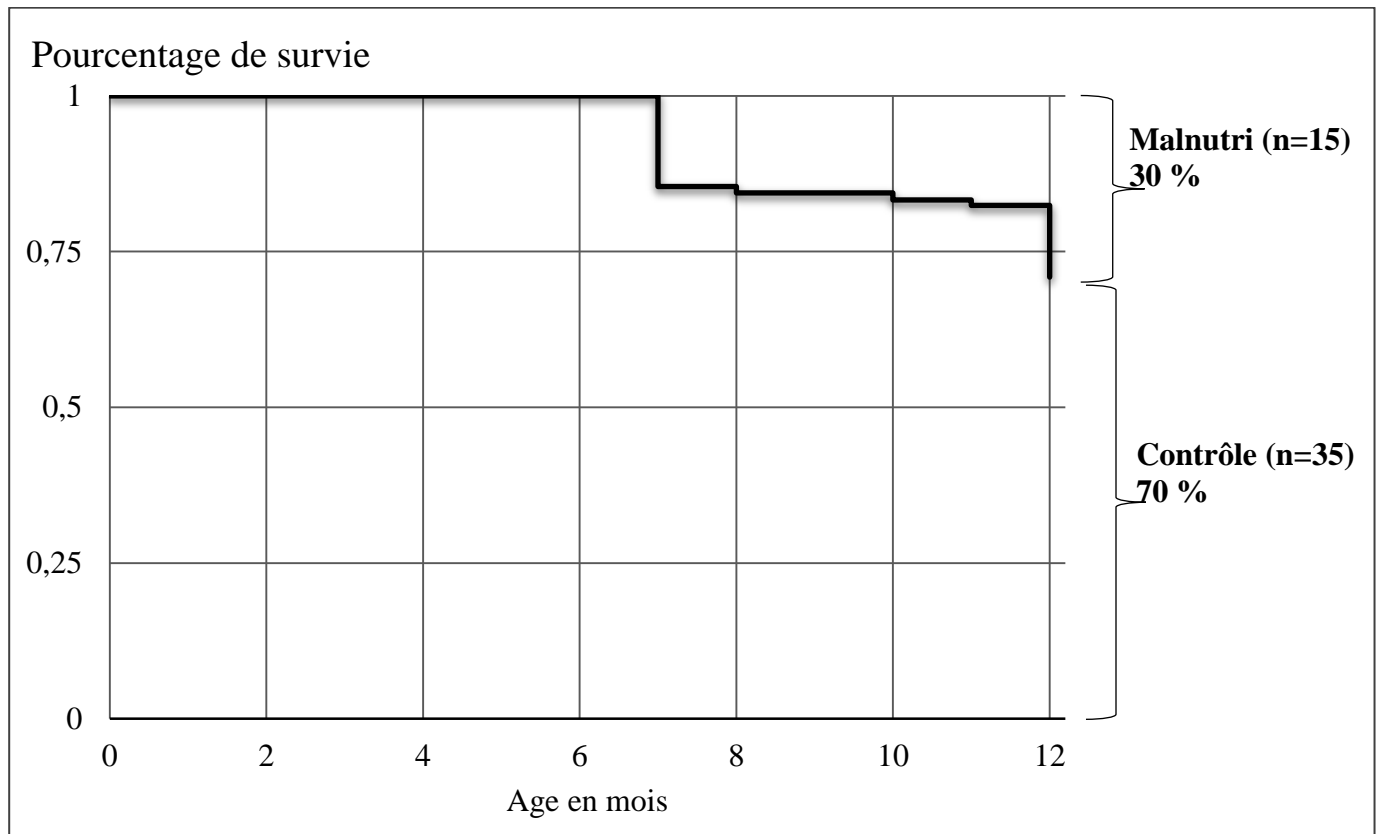
La consommation d'une dose quotidienne du son de riz en plus de la vitamine A a eu un impact sur la diarrhée. Le risque d'avoir la diarrhée a été plus élevé dans le bras témoins soit 65 % contre 35 % pour le bras son de riz plus vitamine A. Cette différence a été statistiquement significative (OR = 0,36 ; p = 0,041).



**Figure 7** : Impact de la consommation du son de riz sur la diarrhée

Les épisodes de diarrhées ont été plus remarquables chez les enfants qui ont pris de la vitamine A seule. La consommation du son de riz a eu aussi un impact positif significatif sur les épisodes de diarrhée, les épisodes de diarrhée ont été moins fréquents chez les enfants recevant une dose du son de riz en plus de la vitamine A (OR = 0,06 ; p = 0,00017).

### 3.2. Evolution de l'état nutritionnel des enfants au cours de l'étude :



**Figure 8 :** Evolution de l'état nutritionnel des enfants au cours du suivi

La figure 8 montre la courbe de survie de Kaplan-Meier qui traduit l'évolution de l'état nutritionnel des 50 enfants au cours de l'étude. Au cours du suivi, la malnutrition est survenue chez 15 enfants qui ont été classés dans le groupe malnutri selon le z-score poids/taille. Les 35 enfants restant n'ayant pas connu la malnutrition ont constitué le groupe contrôle.

**Tableau VIII :** Répartition des enfants en fonction de l'âge et du z-score poids/taille

Age en mois	Groupe	
	Malnutri (n = 15)	Contrôle (n = 35)
	z-scores < -2	z-scores ≥ -2
7	7	43
8	8	42
9	8	42
10	9	41
11	10	40
12	15	35

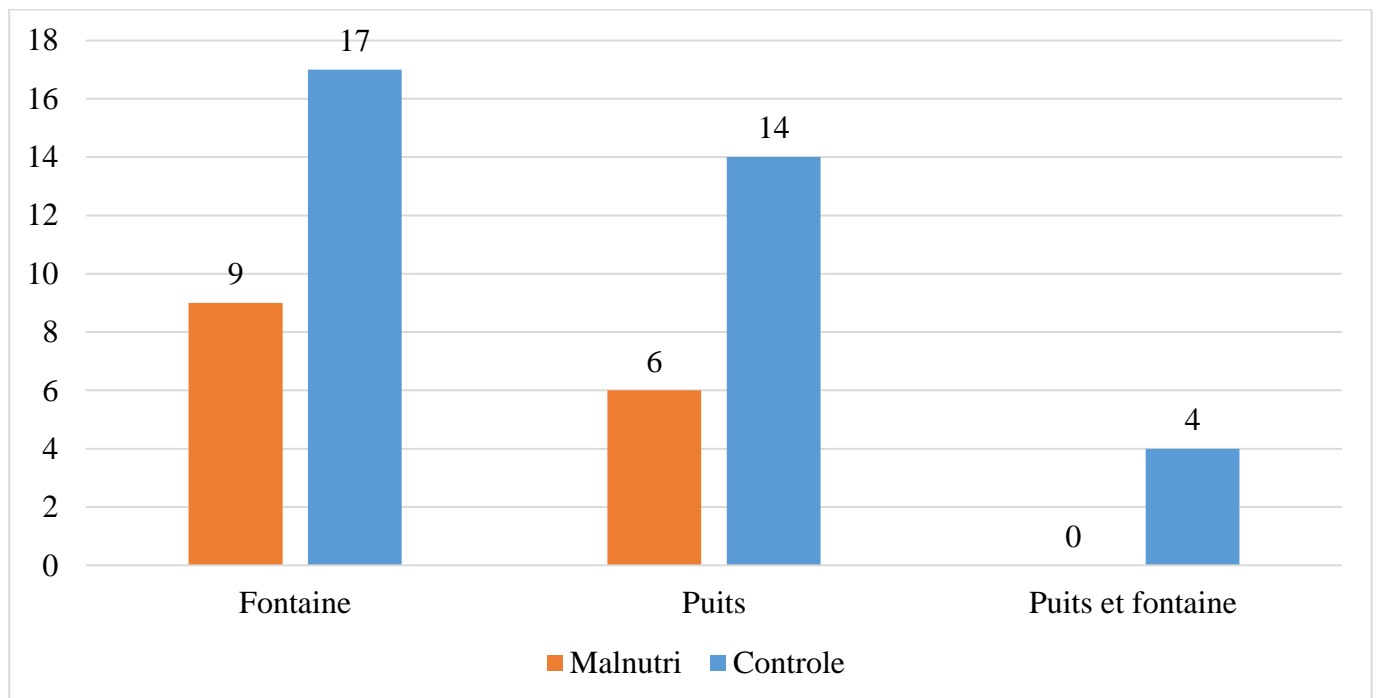
Nous avons eu beaucoup de cas de malnutrition au 7<sup>ème</sup> mois du suivi.



**Tableau IX :** Répartition des groupes en fonction de la consommation du son de riz et/ou de la vitamine A

Groupe d'étude	Son de riz + vitamine A	Vitamine A	Total	Odds Ratio
	Effectif (%)	Effectif (%)	Effectif (%)	
Malnutri	5 (20)	10 (40)	15 (30)	0,37
Control	20 (80)	15 (60)	35 (70)	
Total	25	25	50	

La malnutrition a été beaucoup plus fréquente chez le groupe d'enfants qui était sous la vitamine A seule avec une fréquence de 40 % contre 20 % pour le groupe son de riz en plus de la vitamine A (OR = 0,37 ; p = 0,06). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative.

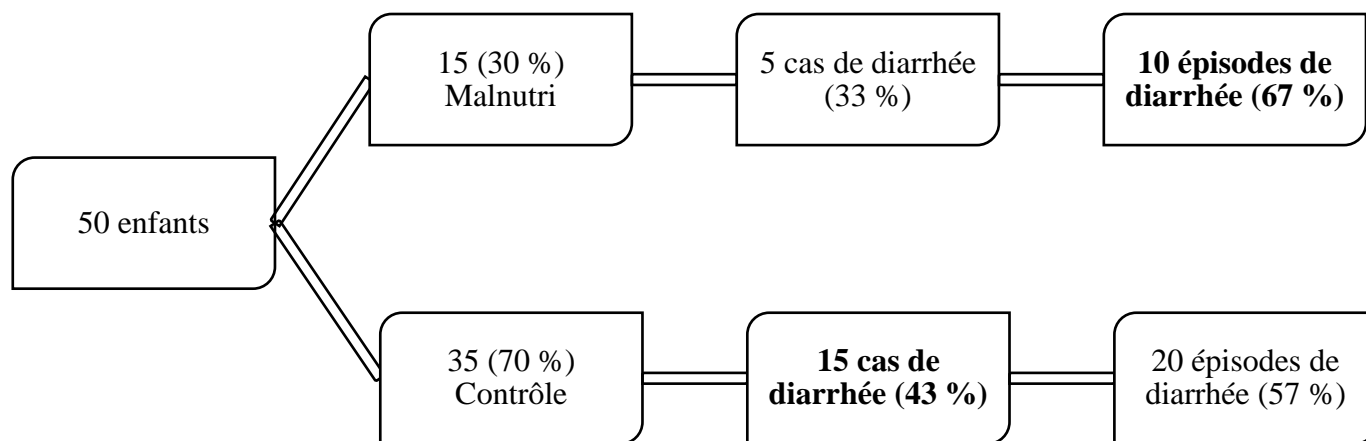


**Figure 9 :** Répartition des groupes en fonction de la source d'approvisionnement en eau

La source d'eau n'a pas eu d'impact sur la survenue de la malnutrition. Il n'y a pas eu de différence statistiquement significative dans l'association entre la malnutrition et la source d'approvisionnement en eau de boisson (OR = 1,23 ; p = 0,74).

### 3.3. Données sur les épisodes de diarrhée :

La fréquence a été plus élevée dans le groupe contrôle 43 %. Il n'y a pas eu une différence significative entre l'association la diarrhée à la malnutrition (OR = 0,66 ; p = 0,52).



**Figure 10 :** Répartition des épisodes de diarrhée en fonction des groupes d'étude

Sur les 15 enfants malnutris, il y'a 67 % qui ont fait en moyenne 10 épisodes de diarrhée, tandis que 15 enfants (57 %) ont fait en moyenne 20 épisodes de diarrhée (OR =1,5 ; p = 0,27). Le risque d'avoir des épisodes de diarrhée a été plus élevé dans le groupe malnutri (33 %).

### 3.4. Caractéristiques phénotypiques :

Les échantillons des selles ont été ensemencés sur les géloses de Mac Conkey et Hektoen. Ce sont deux milieux de culture sélectifs permettant l'isolement d'*Escherichia coli*. Après isolement, nous sommes passés à l'identification des souches d'*E. coli* en utilisant une série de 08 tests biochimiques.

**Tableau X :** Répartition des échantillons de selles en fonction des résultats de la culture et des tests biochimiques

Identification d' <i>E. coli</i>	Effectifs	Fréquence (%)
<i>E. coli</i>	269	76
Autres bactéries*	60	17
Cultures stériles	24	7
Total	353	100

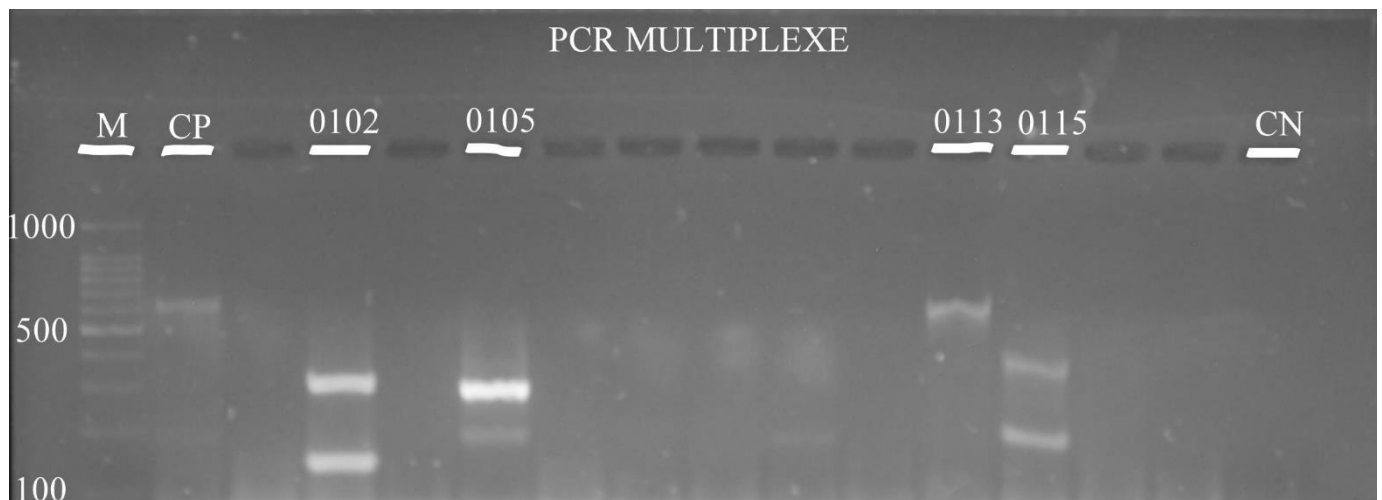
\* non identifiées

**Tableau XI :** Répartition des souches d'*E. coli* en fonction des groupes d'étude

Souches	Groupe	
	Malnutri (n = 15) Effectif (%)	Contrôle (n = 35) Effectif (%)
Souches confirmées <i>E. coli</i>	39 (11)	230 (65)

Sur les 269 souches d'*E. coli* isolées, 39 soit (11 %) souches ont été associées à la malnutrition.

### 3.5. Caractéristiques moléculaires :



**Figure 11** : Image d'une PCR multiplexe (Image Laboratoire)

M : Marqueur en paire de bases

CP : Contrôle positif

CN : Contrôle négatif

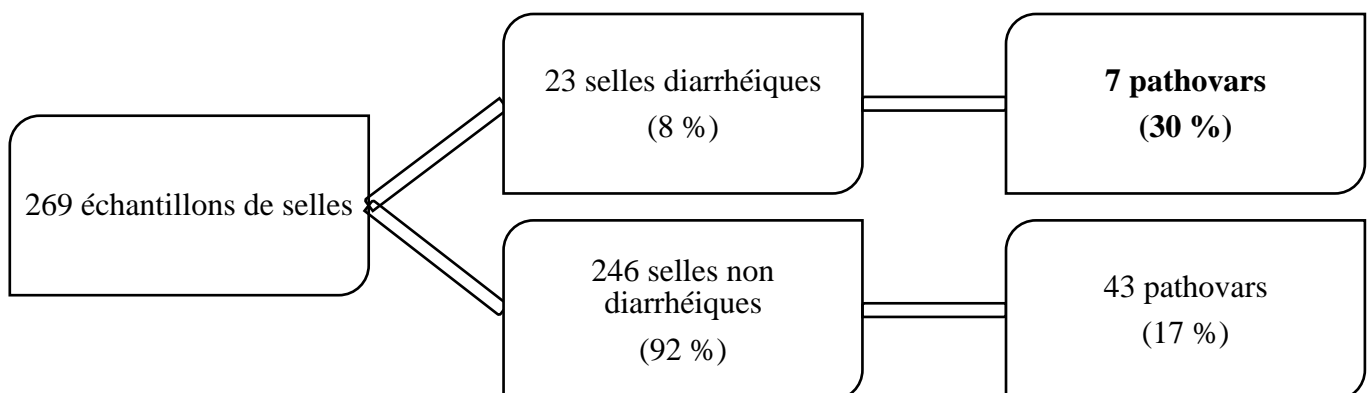
0102 : ETEC

0105 : EIEC

0113 : EAEC

0115 : EPEC

Pour l'identification des pathovars d'*E. coli* nous avons réalisé la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur 76 % (269/353) de nos échantillons de selles. Les résultats de la PCR nous ont permis d'affirmer la présence de 43 pathovars (17 %) d'*E. coli* dans les échantillons de selles non diarrhéiques et de 07 pathovars (30 %) dans les échantillons de selles diarrhéiques soit une présence globale d'*E. coli* dans 19% (50/269) de nos échantillons comme illustré sur la figure 12.



**Figure 12 :** Répartition des échantillons en fonction des selles diarrhéiques non diarrhéiques et des pathovars

Les pathovars ont été plus fréquents dans les selles diarrhéiques (OR = 2 ; p = 0,06).

**Tableau XII :** Répartition des échantillons en fonction des gènes et des pathovars détectés

Souches	Gènes	Diarrhée aiguë	Non diarrhée	Odds	Valeur	Total
		Effectif n = 23 (%)	Effectif n = 246 (%)	Ratio	de p (X <sup>2</sup> )	n = 269 (%)
<b>EAEC</b>	<i>Pcvd432</i>	<b>6 (26)</b>	<b>17 (7)</b>	<b>4,7</b>	<b>0,001</b>	<b>23 (9)</b>
EHEC	Tout	0	8 (3)	NA	0,37	8 (3)
	<i>vt1</i>	0	5			5
	<i>Vt2</i>	0	2			2
	<i>vt1/vt2</i>	0	1			1
<b>EIEC</b>	<i>ial</i>	<b>1 (4)</b>	<b>4 (2)</b>	<b>2,73</b>	<b>0,35</b>	<b>5 (2)</b>
EPEC	Tout	0	7 (3)	NA	0,41	7 (3)
	<i>eaeA</i>	0	4			4
	<i>bfpA</i>	0	3			3
ETEC	Tout	0	7 (3)	NA	0,41	7 (3)
	<i>estA</i>	0	6			6
	<i>eltB/estA</i>	0	1			1
Total		7 (30)	43 (17)	1,98	0,13	50 (19)

Il a pu y avoir une association non significative entre la charge totale des pathogènes et les selles diarrhéiques (OR = 2 ; p = 0,13).

Le pathovar EAEC a été le plus représenté dans les selles diarrhéiques avec une différence significative (OR = 4,5 ; p = 0,001).

La fréquence des pathovars d'*E. coli* a été plus élevée dans les échantillons de selles diarrhéiques (30 %) contre (17 %) pour les échantillons de selles non diarrhéiques avec une différence de risque statistiquement significative (p = 0,03).

**Tableau XIII** : Répartition des pathovars d'*E. coli* en fonction des groupes d'étude

Pathovars d' <i>E. coli</i>	Groupe		Odds Ratio	Valeur de p (X <sup>2</sup> )
	Malnutri (n = 15) Effectif (%)	Contrôle (n = 35) Effectif (%)		
EAEC	2 (13)	21 (60)	0,10	0,001
EHEC	2 (13)	7 (20)	0,61	0,28
EIEC	0 (0)	4 (11)	NA	0,08
EPEC	2 (13)	5 (14)	0,92	0,46
ETEC	1 (7)	6 (17)	0,34	0,16

Il y a eu une association statistiquement significative entre la charge totale des pathovars et le groupe contrôle (OR = 0,31 ; p = 0,006). Le pathovar EAEC a été plus représenté dans le groupe contrôle avec une différence statistiquement significative (OR = 10 ; p = 0,001).

# **Commentaires et discussion**

#### 4. Commentaires et discussion :

---

L'objectif principal de notre étude a été d'identifier le danger lié à la présence des souches pathogènes d'*E. coli* au niveau de la flore intestinale de 50 enfants à travers les études microbiologiques, biochimiques et moléculaires réalisées sur des échantillons de selles collectées entre Novembre 2015 et Mai 2016 à Dioro.

##### 4.1. Méthodologie :

La commune rurale de Dioro a été choisie pour la réalisation de cette étude. Les manipulations ont été effectuées sur le plateau technique mise en place à Dioro par le LBMA au cours du projet (ICEMR). Les données ont été collectées sur les formulaires de report de cas (FRC) et saisies dans une base de données dans le logiciel Excel (2010).

Les enfants ont été examinés (cliniquement) par un médecin généraliste à l'enrôlement et au cours du suivi. Notre étude a porté sur une population de 50 enfants de la localité de Dioro en période de sevrage. Les familles de ces enfants ont été réparties entre 06 quartiers et ont utilisé 02 types de sources d'approvisionnement en eau de boisson (puits et fontaines). Le suivi s'étendait sur 06 mois.

Pendant la période de novembre 2015 à mai 2016 un total de 353 échantillons dont 323 échantillons de selles non diarrhéiques (92 %) et 30 échantillons de selles diarrhéiques (8 %) de 50 enfants inclus dans notre étude a été recueilli. Ces échantillons ont d'abord étéensemencés sur les géloses Mac Conkey et Hektoen pour isoler *E. coli*. Mais cependant tous les échantillons n'ont pas poussé sur ces géloses et certains échantillons ont donné plusieurs types de colonies, nous nous sommes appuyés sur les caractéristiques de culture conventionnelles décrites dans les textes pour apprécier la morphologie des colonies de bactéries [56]. Ces colonies ont ensuite été repiquées sur ces mêmes géloses pour l'obtention des colonies pures avant de les soumettre aux tests biochimiques dont nous disposions. Plusieurs colonies ont présenté des caractéristiques biochimiques semblables à celles des souches d'*E. coli* par les tests biochimiques réalisés sur ces colonies pures. Nous avons réalisé la PCR directement sur l'ADN des colonies bactériennes contrairement à une étude menée par Al-Gallas et al. au Tunisie en 2007 [72] ; Konaté et al. au Burkina Faso en 2017 [73] qui ont confirmé tous les résultats des tests biochimiques classiques avec le système Api 20 E avant d'appliquer la technique moléculaire (PCR).

Nous avons utilisé la PCR multiplexe en utilisant 8 paires d'amorces spécifiques comme une étude menée par Nguyen et al. au Vietnam en 2005 [21] et une autre par Vilchez et al. au Nicaragua en 2009 [22]. La PCR multiplexe nous a permis d'identifier simultanément 5 pathovars d'*E. coli* si ils ont été présents sur les échantillons testés. Plusieurs études récentes ont utilisé d'autres types de PCR pour la détection des pathovars d'*E. coli* notamment une étude mener par Onverwagt et al. au Canada en 2017 [69] qui ont réalisé une PCR multiplexe mais avec 16 paires d'amorces spécifiques. Deux autres études, Tickell et al. au Burkina Faso en 2017 [74] ; Konaté et al. au Kenya en 2017 [73] ont effectué une PCR en temps réel.

#### **4.2. Evolution de l'état nutritionnel des enfants au cours de l'étude :**

Le z-score poids/taille nous a permis de déterminer l'évolution de l'état nutritionnel des enfants durant le suivi. Nous avons réalisé la figure de Kaplan-Meier (Figure 9) permettant d'estimer le pourcentage de survie, c'est-à-dire le pourcentage des enfants n'ayant pas connu la malnutrition durant le suivi qui a été de (70 %). Le pourcentage des enfants ayant connu la malnutrition a été de (30 %), 15 enfants soit 30 % de notre population d'étude ont connu une malnutrition aiguë touchant aussi bien le genre masculin que le genre féminin.

Les enfants du bras vitamine A seule ont été plus représentés dans le groupe malnutri 10/25 soit (40 %) que ceux du groupe son de riz 5/25 soit (20 %), cette différence n'a pas été significative (OR = 0,37). Le risque pour chaque enfant qui a pris de la vitamine A seule de tomber dans le groupe malnutri a été légèrement élevé par rapport au risque chez les enfants qui ont pris une dose quotidienne du son de riz en plus de la vitamine A (57 % contre 33 %). Nous proposons les valeurs nutritionnelles du son du riz pour expliquer pourquoi les enfants prenant de la vitamine A seule étaient plus représentés dans le groupe malnutrition.

Considérant la source d'approvisionnement en eau de boisson, le puits et la fontaine ont été les sources d'approvisionnement en eau utilisées par les familles des enfants de notre population d'étude. Les enfants ont été répartis en fonction de la provenance de l'eau de boisson. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative relative à l'association entre la malnutrition et la source d'approvisionnement en eau de boisson (OR = 1,23). Le risque a été légèrement élevé au niveau des fontaines (60 % contre 54 %).

#### **4.3. Données sur les épisodes de diarrhée :**

Plusieurs études ont rapporté une association entre la diarrhée et la malnutrition [75,76].

Sur un total de 353 échantillons de selles, les selles diarrhéiques ont représenté (8 %) soit 30/353 et les selles non diarrhéiques (92 %) soit 323/353.

La consommation d'une dose quotidienne du son de riz en plus de la vitamine A a pu avoir un impact positif sur la santé des enfants. Car en terme du nombre d'enfants ayant eu la diarrhée, il y'a eu dans le bras son de riz plus vitamine A 7/25 enfants (28 %) ayant eu une diarrhée contre 13/25 enfants (52 %) dans le bras vitamine A seule (témoin). Quatre sur vingt et cinq (4/25) enfants (16 %) de plus ont eu la diarrhée parmi les enfants qui ont pris de la vitamine A seule. Nous avons remarqué une diminution statistiquement significative en terme du nombre d'enfants ayant eu la diarrhée chez le groupe d'enfant consommant une dose quotidienne du son de riz en plus de la vitamine A par rapport au groupe vitamine A seule (témoin) (OR = 0,35). Le risque pour un enfant du groupe témoins (vitamine A) d'avoir une diarrhée a été de (65 %). Par ailleurs, en terme d'épisodes de diarrhée le bras son de riz a eu 8 épisodes de diarrhée (32 %) contre 22 épisodes pour le bras vitamine A (88 %) soit une réduction de (56 %) d'épisodes de diarrhée en faveur du bras son de riz, cette différence a été statistiquement significative (OR = 0,06). Nous suggérons que la



consommation d'une dose quotidienne du son de riz en plus de la vitamine A a été à l'origine d'une diminution statistiquement significative de la fréquence des épisodes de diarrhée dans ce groupe. Le risque d'avoir un épisode de diarrhée a été plus faible chez ces derniers par rapport aux témoins (35 % contre 65 %).

Quant à la relation entre la malnutrition et la diarrhée, une étude menée par Ferdous et al. chez les enfants vivant dans les zones rurales du Bangladesh en 2013 [75] a révélé une sévérité de la diarrhée chez les enfants malnutris, cependant dans notre étude nous n'avons pas trouvé une différence significative entre la malnutrition et la diarrhée en terme du nombre d'enfants ayant eu la diarrhée dans les deux groupes (malnutri/contrôle). Ceci peut aussi être dû à la petite taille des échantillons de diarrhée (30 échantillons) de notre étude ou au fait que nous avons eu peu d'enfants malnutris dans l'étude. Cependant il y a pu avoir une association entre le nombre des épisodes de diarrhée et la malnutrition. La fréquence des épisodes de diarrhée a été plus élevée chez les enfants malnutris (67 % contre 57 %; OR = 1,5).

#### **4.4. Paramètres phénotypiques :**

Nous avons soumis 353 colonies de bactéries aux tests biochimiques, 269/353 soit (76 %) des colonies de bactéries ont donné des caractéristiques de culture des souches d'*Escherichia coli* contre 60/353 soit (17 %) des colonies qui ont présenté des caractéristiques de culture d'autres bactéries, nous n'avons pas identifié ces bactéries. Etant donné que nous avons utilisé des milieux de cultures sélectifs pour les entérobactéries nous pouvons aussi penser que d'une part que ces bactéries ont un rôle à jouer dans la détérioration de l'état de santé des enfants de notre étude.

Nous avons isolé beaucoup plus de souches d'*E. coli* par les tests biochimiques dans les échantillons provenant des enfants du groupe contrôle (65 %). Ces résultats ont confirmé notre hypothèse sur l'abondance de la flore commensale intestinale des enfants bien nourris par rapport aux enfants malnutris. Cependant les souches pathogènes isolées chez les malnutris ont pu être les plus virulentes.

Nous avons observé 24/353 cultures stériles soit (7 %) de nos échantillons, ce résultat a pu être dû aux conditions de prélèvement, de conservation, de transport ou même au niveau de dilution des échantillons. Aussi nous avons utilisé deux milieux de culture sélectifs pour la culture des bactéries.

Ces résultats nous conduisent à la notion du dysfonctionnement entérique environnemental (DEE) [77].

#### **4.5. Le dysfonctionnement entérique :**

La croissance et le statut nutritionnel sont fortement influencés par le dysfonctionnement entérique environnemental selon Jones et al. au Kenya en 2014 [78].

Nous avons enregistré le plus grand nombre de cas de malnutrition à la période où les enfants ont été âgés de 7 mois 7/15 soit (47 % du nombre total des malnutris, n = 15), correspondant à la période de sevrage en général et à l'ajout d'autres aliments dans l'alimentation de l'enfant [57]. Cette nouvelle alimentation a pu

être la source de microorganismes ou a pu créer des circonstances pouvant entraîner un dysfonctionnement entérique environnemental (DEE) au niveau de la flore commensale intestinale des enfants en période de sevrage. Le dysfonctionnement entérique environnemental a été caractérisé par une inflammation intestinale [79] et une augmentation de la perméabilité intestinale [80]. Il a été indexé comme une cause fréquente de croissance sous-optimale lors d'une étude chez des enfants atteints de kwashiorkor par Jones et al. au Kenya en 2014 [81]. L'abondance de la flore intestinale des témoins dans notre étude a pu signifier qu'ils ont été aussi exposés au danger de tomber dans le groupe malnutrition. Cette hypothèse a été confirmée dans la partie moléculaire ou nous avons isolé plusieurs fois chez le même enfant le "même pathovar" avant qu'il ne tombe dans le groupe malnutrition au 11<sup>ème</sup> mois du suivi et même après le pathovar était présent. Il s'est agi du pathovar EAEC.

#### **4.6. Paramètres moléculaires :**

##### **4.6.1. Les gènes de virulence :**

La PCR multiplexe a été utilisée pour l'amplification simultanée de 8 gènes de virulence correspondant à 5 pathovars d'*E. coli*. Nous avons détecté 8 gènes de virulence dans notre étude contrairement à une étude menée par au Mali en 2016 qui a détecté 4 gènes de virulence, les gènes de virulence (*vt1*, *ial*, *pCVD432*, et *bfpA*) n'ont pas été détectés, nous proposons l'abondance de la flore intestinale en entérobactérie retrouvée dans les échantillons de selles par rapport aux échantillons d'eau de boisson pour expliquer cette discordance [15].

Une étude au Nicaragua en 2009 a identifié beaucoup plus de gènes de virulences dans les échantillons de selles diarrhéiques. Le gène *pCVD432* a été le plus représenté dans les selles diarrhéiques et non diarrhéiques ; nous avons trouvé des résultats similaires dans notre étude. Le gène *eltB* (pathovar ETEC) était le seul gène associé à la diarrhée avec une différence significative (OR = 3,3) dans l'étude au Nicaragua, nos résultats sont contradictoires à ce niveau où le gène *pCVD432* (pathovar EAEC) était le seul gène identifié dans les échantillons de selles diarrhéiques avec une différence significative (OR = 4,7). Cette différence pouvant être expliquée par les différences d'environnements, de comportement, de biologie des patients et aussi l'état nutritionnel [22].

##### **4.6.2. Les pathovars d'*E. coli* :**

La charge totale des pathovars a été de 50/269. Dix-neuf pourcent (19 %) des échantillons ont été positifs à *E. coli*. Nous avons détecté 7 pathovars d'*E. coli* (30 %) dans les échantillons de selles diarrhéiques et 43 pathovars (17 %) dans les selles non diarrhéiques. Une association avec une différence statistiquement significative a été démontrée entre la charge totale des pathogènes et les selles diarrhéiques malgré la petite taille d'échantillon (OR = 2). Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les pathovars d'*E. coli* ont été fortement impliqués dans la survenue des maladies diarrhéiques [5].

Une étude cas-témoins chez les enfants âgés de 6-23 mois par Platts-Mills et al. au Bangladesh en 2017, sur l'association entre 32 pathogènes entériques et la malnutrition a révélé que pour tous les agents pathogènes, il n'y a pas eu de différence statistiquement significative dans la quantité (charge) détectée entre les cas et les témoins [82]. Ces résultats sont en contradiction avec nos résultats où nous avons trouvé une association avec une différence statistiquement significative entre 5 pathogènes entériques avec les témoins (OR = 0,31). Ce résultat a confirmé l'hypothèse de trouver beaucoup plus de pathogènes chez les enfants en bonne santé plutôt que chez les enfants malades.

La faible prévalence des pathovars EIEC a déjà été rapportée par Vilchez et al. au Nicaragua en 2009 [22]. Beaucoup d'études ont rapporté que le pathovar EAEC est un pathogène émergent affectant aussi bien les adultes que les enfants [83]. Des études ont permis de faire la proposition d'un modèle de pathogénèse d'EAEC en trois étapes : adhérence abondante à la muqueuse intestinale, production de cytotoxines et d'entérotoxines et l'induction d'inflammation au niveau de la muqueuse [76,84].

Dans la littérature deux études de méta-analyse ont trouvé une association entre la diarrhée et le pathovar EAEC [84,85]. Plusieurs études au Brésil ont rapporté que la diarrhée persistante provoquée par EAEC a été liée à la malnutrition et au développement physique [86,87]. La persistance d'EAEC peut induire une inflammation intestinale chronique, même en l'absence de diarrhée, réduisant sa fonction d'absorption et conduisant à la malnutrition [83]. Notre PCR a porté sur l'amplification du gène de virulence *pCVD432* ; cependant il est possible d'identifier EAEC à travers plusieurs autres gènes de virulence (*aggR*, *aggA*, *aafA*, *aap*, et *astA*) notifiant sa diversité génétique [88,89]. D'autres gènes de virulences ont été rapportés par d'autres études [76].

Nous avons observé une prévalence plus élevée du pathovar EAEC avec une différence statistiquement significative dans les échantillons de selles diarrhéiques, un agent pathogène qui a été associé à la diarrhée aiguë dans des études antérieures, notamment Jensen et al. au Danemark en 2014 [76] et Huang et al. aux Etats-Unis en 2006 [90].

Nos résultats ont concordé à ceux d'une étude réalisée par Aijuka et al. en Afrique du Sud en 2018 qui ont trouvé une fréquence élevée du pathovars EAEC (24 %) [91].

Selon Tickell et al. au Kenya en 2018, les enfants souffrant de malnutrition aiguë ont été environ 2 fois plus susceptibles d'avoir le pathovar EAEC dans leurs selles que les enfants bien nourris [74], ce résultat est en contradiction avec le nôtre où le pathovar EAEC a été le seul isolé avec une différence statistiquement significative chez le groupe contrôle.

Notre résultat ont été similaire à ceux de plusieurs études qui ont montré que les cargaisons du pathovar EAEC à long terme peuvent causer la malnutrition en provoquant une inflammation entérique et une malabsorption subséquente ou une inflammation systémique [85,92]. Nous proposons la diversité génétique considérable des pathovars EAEC pour expliquer nos résultats.

Le fait que nous n'avons pas isolé beaucoup de pathovars chez les enfants bien nourris dans notre étude a pu être dû aussi au fait que nous avons environ eu 02 fois plus de témoins (35 enfants) que de cas (15 enfants). Nous avons donc eu à tester beaucoup plus d'échantillons provenant des témoins que des cas.

Cette étude souligne la nécessité de mener des études plus approfondies pour comprendre la transition entre le commensalisme et la pathogénicité des souches d'*E. coli* afin d'augmenter l'efficacité des efforts fournis dans le sens de la lutte contre la diarrhée et la malnutrition.

Cette étude a plusieurs limites, la notion même de la détermination de l'état nutritionnel en utilisant la table poids/taille, bien qu'approuvée par l'OMS pour l'identification de la malnutrition aiguë, elle a pu être influencée par la difficulté dans la prise de la mesure de la taille. Les enfants atteints de diarrhée ont un degré élevé de déshydratation. La déshydratation a pu entraîner une perte de poids au moment des épisodes de diarrhées. Aussi le temps du suivi qui a été de 6 mois a pu ne pas permettre de bien élucider la relation temporelle entre l'infection entéropathogène et la malnutrition. Le dernier mois du suivi (enfants âgés de 12 mois) a été le deuxième mois où nous avons enregistré le plus le grand nombre de malnutrition après le premier mois du suivi (enfant âgés de 7 mois). Ils ont été suivis en tant que malnutri seulement durant un mois.

# **Conclusion et recommandations**

## 5. Conclusion et recommandations :

---

### 5.1. Conclusion :

La malnutrition constitue un véritable problème majeur de sante publique dans les pays en voie de développement. La présence des souches pathogènes d'*E. coli* au niveau de flore intestinale des enfants peut être la cause de diarrhée qui à la longue peut être cause de la malnutrition.

La consommation du son de riz en réduisant la fréquence de la diarrhée pourrait être une alternative dans la prévention et la prise en charge de la malnutrition.

EAEC est l'un des pathovars les plus fréquemment associés à la fois à la diarrhée et à la malnutrition dans les pays en voie de développement. Toutefois la présence des souches pathogènes d'*E. coli* n'est pas toujours associée à la malnutrition.

Ces caractéristiques soulignent l'intérêt de mener des études plus approfondies pour comprendre la transition entre pathogénicité et commensalisme. Chercher à comprendre comment le lien entre le commensalisme et la pathogénicité peut fluctuer d'une relation de symbiose à celle d'une pathologie.

### 5.2. Recommandations :

Au terme de cette étude, nous recommandons :

- Au LBMA et partenaires : d'utiliser la technique de séquençage pour comprendre la transition entre le commensalisme et la pathogénicité d'*E. coli*.
- A la population de Dioro : d'utiliser les bonnes pratiques permettant d'avoir une eau de boisson potable.
- Au Ministère de la santé et de l'hygiène publique : d'appuyer les chercheurs dans l'amélioration de la sécurité nutritionnelle et sanitaire des enfants dans le but de diminuer l'incidence de la diarrhée et par cela, celle de la malnutrition.

# Références

## 6. Références :

---

1. Sylla MB. Infections invasives à *Escherichia coli* dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Toure de Bamako [Thèse]. Bamako : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2005.
2. Sangare SA, Rondinaud E, Maataoui N, Maiga AI, Guindo I, Maiga A, Camara N, Dicko OA, Dao S, Diallo S, Bougoudogo F, Andremont A, Maiga II, Armand-Lefevre L. Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in bacteriemic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali. PLOS ONE. 2017;12(2):e0172652.
3. Douyon S. Impact du son de riz sur la croissance et la prévention de la diarrhée chez les enfants en sevrage a Dioro : cas de 50 enfants [Thèse]. Bamako : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2017.
4. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(3):382-403.
5. Saidi O. Les diarrhées aigües communautaires infantiles [Internet] [Thèse]. Rabat : Université Mohammed V; 2018 [consulté 16 Juin 2018]. Disponible sur: <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/handle/123456789/16362>
6. Cohen N, Karib H. Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés : Un réel problème de santé publique. Technol Lab. 2006;1:4–9.
7. Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, Redman JC, Persson S, Simon J, Kotloff KL, Levine MM, Sow S, Tamboura B, Toure A, Malle D, Panchalingam S, Krogfelt KA, Nataro JP. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. J Infect Dis. 2012;205(3):431-44.
8. Ministère de la Sante ; Secrétariat General ; Direction Nationale de la Sante ; Division Nutrition. Manuel sur la prise en charge de la malnutrition aiguë au Mali. 2011.
9. Département Technique ; Action Contre La FAIM-Fr. Dynamiques des interactions : malnutritions, eau assainissement hygiène, infections. 2007;
10. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* thermotolérants dans les échantillons solides ou semi-solides : méthode par filtration sur membrane utilisant le milieu de culture mFC-BCIG, MA. 705 – Ec-BCIG 1.0, Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs du Québec, 2013, 17 p.
11. Mainil J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : I : les adhésines et facteurs de colonisation. Ann Med Vet. 2003;147:105–126.
12. Penit P. Etude épidémiologique des gastro-entérites aiguës médicalisées et spécificités chez l'enfant [Thèse]. Rouen : Université De Rouen; 2014.



13. Oulymata G. Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à gram négatif [Thèse]. Dakar : Université Cheikh Anta Diop de Dakar; 2007.
14. Ramberg CC. Molecular characterization of Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing the chromosomal AmpC beta-lactamase : a regional spread of an IS911-mediated blaAmpC-hyperexpressing ST131 clone. 2012 [consulté 26 Mars 2018]; Disponible sur: <https://munin.uit.no/handle/10037/4228>
15. Kone K. Etude microbiologique de l'eau de boisson à Dioro : Relation entre la malnutrition et le portage d'*Escherichia coli* à travers la consommation d'eau de boisson [Thèse]. Bamako : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2017.
16. Omar K, Barnard T. Detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in clinical and environmental water sources in South Africa using single-step 11-gene m-PCR. World J Microbiol Biotechnol. 2014;30(10):2663-71.
17. Baliere C. Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC [Internet]. Université de Bretagne Occidentale; 2016 [consulté 26 Mars 2018]. Disponible sur: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00312/42322/>
18. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodríguez-Baño J, Baquero F, Soto SM. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. FEMS Microbiol Rev. 2016;40(4):437-63.
19. Guiral E, Bosch J, Vila J, Soto SM. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence: *Escherichia coli* in pregnant and nonpregnant women. FEMS Microbiol Lett. 2011;314(2):170-3.
20. Mainil J, Van Bost S. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: IV : Souches nécrotoxigènes. Ann Méd Vét. 2004;148:121–132.
21. Nguyen TV, Van PL, Huy CL, Gia KN, Weintraub A. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol. 2005;43(2):755-60.
22. Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. J Med Microbiol. 2009;58(5):630-7.
23. Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiology. 2003;149(12):3575-86.
24. Lefebvre P, Rigo J-M, Leprince P, Rogister B, Delrée P, Hans P, Born J-D, Moonen G. Agressologie : revue internationale de physio-biologie et de pharmacologie appliquées aux effets de l'agression. 0002-114829 [Internet]. 1988 [consulté 27 Mars 2018]; Disponible sur: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE2014104070>

25. Smati M, Clermont O, Bleibtreu A, Fourreau F, David Anthony, Daubie AS. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *MicrobiolOpen*. 2015;4(4):604-15.
26. Darcan C, Ozkanca R, Idil O, Flint KP. Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water. *Pol J Microbiol*. 2009;58(4):307-17.
27. Pommepuy M, Butin M, Derrien A, Gourmelon M, Colwell RR, Cormier M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(12):4621-6.
28. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2014;5:258.
29. Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, Mladonicky JM, Whittam TS. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol*. 2007;9(9):2274–2288.
30. Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE, Sadowsky MJ. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(1):612–621.
31. Power ML, Littlefield-Wyer J, Gordon DM, Veal DA, Slade MB. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environ Microbiol*. 2005;7(5):631–640.
32. Tymensen LD, Pyrdok F, Coles D, Koning W, McAllister TA, Jokinen CC, Dowd SE, Neumann NF. Comparative accessory gene fingerprinting of surface water *Escherichia coli* reveals genetically diverse naturalized population. *J Appl Microbiol*. 2015;119(1):263–277.
33. Zhang Q, Yan T. Correlation of intracellular trehalose concentration with desiccation resistance of soil *Escherichia coli* populations. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(20):7407–7413.
34. Dobrindt U. Pathogenomics of *Escherichia coli* [Internet]. 2005 [consulté 27 Mars 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16238013>
35. Payros D. Étude de l'effet de la colonisation des nouveau-nés par des souches de *Escherichia coli* génotoxiques sur le développement et la fonctionnalité de la barrière intestinale [Thèse]. Toulouse : Université Paul Sabatier; 2012.
36. Diallo AM. *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale: prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire [Thèse]. Toulouse : Université Paul Sabatier; 2013. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2013TOU30162>
37. Organisation mondiale de la santé. Malnutrition : prévention de la malnutrition par la promotion de bonnes pratiques d'hygiène alimentaire. Module 7.P 27.

38. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):360–370.
39. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):142-201.
40. Guinée P, Jansen WH, Wadström T, Sellwood R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea* [Internet]. Springer, Dordrecht; 1981 [consulté 27 Mars 2018]. p. 126-62. (Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science). Disponible sur: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-8328-1\\_18](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-8328-1_18)
41. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol.* 1984;157(2):690–693.
42. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics.* 2008;9(1):560.
43. Smati M, Clermont O, Le Gal F, Schichmanoff O, Jauréguy F, Eddi A, Denamur E, Picard B. Real-time PCR for quantitative analysis of human commensal *Escherichia coli* populations reveals a high frequency of subdominant phylogroups. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(16):5005–5012.
44. Clermont O, Christenson JK., Erick D, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58-65.
45. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4555–4558.
46. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguéne C, Denamur E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 2004;21(6):1085–1094.
47. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(3):207.
48. Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Selander RK, Whittam TS. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature.* 2000;406(6791):64.
49. Wang L, Wakushima M, Aota T, Yoshida Y, Kita T, Maehara T, Ogasawara J, Choi C, Kamata Y, Hara-Kudo Y. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(4):1232–1240.
50. Badouei MA, Jajarmi M, Mirsalehian A. Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015;38:15–20.

51. Martins FH, Guth BEC, Piazza RM, Leao SC, Ludovico A, Ludovico MS, Dahbi G, Marzoa J, Mora A, Blanco J. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, Southern Brazil. *Vet Microbiol.* 2015;175(1):150–156.
52. Girardeau JP, Dalmasso A, Bertin Y, Ducrot C, Bord S, Livrelli V, Vernozy-Rozand C, Martin C. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):6098–6107.
53. Imamovic L, Ballesté E, Jofre J, Muniesa M. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(17):5693–5701.
54. Ciupescu LM, Nicorescu IM, Mihai I, Dumitrache R, Tanasuica R. One-year follow up study for the detection of STEC in food of animal origin-the presence of the main virulence genes, present and future potential risk for consumers. *Sci Works Ser C Vet Med.* 2015;61(1):220–225.
55. Scheutz F. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Enterohemorrhagic Escherichia coli Shiga Toxin-Prod E Coli.* 2015;17-36.
56. Gillespie S, Hawkey PM. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology.* London: John Wiley & Sons; 2006. 621 p.
57. Mukuku O, Mutombo AM, Kamona LK, Lubala TK, Mawaw PM, Aloni MN, Wembonyama SO, Luboya ON. Développement d'un score prédictif de malnutrition aiguë sévère chez les enfants de moins de 5 ans. *Pan Afr Med J [Internet].* 2018 [consulté 15 Juin 2018];29. Disponible sur: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/29/185/full/>
58. Diarra I. Evaluation de la prise en charge de la malnutrition aiguë sévère des enfants de 06 à 59 mois à l'ureni du centre de sante de référence de Koutiala en 2014 [Thèse]. Bamako : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2015.
59. Roullaud S. Programme nutritionnel supplémentaire au Sénégal : étude rétrospective et prospective à partir de 35 enfants malnutris [Thèse]. Nancy : Université Henri Poincaré; 2001.
60. Savadogo AS. La malnutrition chez les enfants de 0–5 ans à l'Hôpital Nianankoro Fomba de Ségou [Thèse]. Bamako : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2007.
61. Organisation mondiale de la santé. La Prise en charge de la malnutrition sévère : manuel à l'usage de médecins et autres personnels de santé à des postes d'encadrement. Genève: OMS ; 2000. 2000;72.
62. Médecin Sans Frontière. Lutter contre la combinaison fatale de malnutrition et paludisme, Niger [Internet]. 2013. Disponible sur: [http://www.msf.fr/sites/www.msf.fr/files/niger\\_dossier-fr.pdf](http://www.msf.fr/sites/www.msf.fr/files/niger_dossier-fr.pdf)
63. Gopalan S. Malnutrition: causes, consequences, and solutions. *Nutrition.* 2000;16(7):556–558.

64. Dosso M, Coulibaly M, Kadio A. Place des diarrhées bactériennes dans les pays en développement. Inst Pasteur Côte D'Ivoire. 1998;(n°PF02):4.
65. Diagne I, Camara B, Ba M, N'Diaye O, Cissé M, Sow H. Diarrhées infantiles en pratique hospitalière. L'expérience du service de pédiatrie du CHU de Dakar. Médecine Afr Noire. 1993;40(5):349–353.
66. Chevalier P, Delpuech F, Maire B. Le complexe “malnutrition-infection”: premier problème de santé publique chez les populations défavorisées. Méd Mal Infec. 1996;26:366–370.
67. Coulibaly C. Connaissances, attitudes et pratiques des mères ou gardiennes d'enfants malnutris face à la malnutrition des enfants de 6 à 59 mois vus en consultation au CSRéf de Niono en 2013. [Thèse]. Bamako : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2014.
68. Traore YS. Evaluation de l'état nutritionnel des enfants de 6 à 59 mois dans le cercle de Koutiala en 2013. [Thèse]. Bamako : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2013.
69. Onverwagt E. Influence of an enteric infection on the intestinal epithelial barrier function of severely malnourished mice [Thèse]. Canada ; 2017.
70. IGM | Institut Géographique du Mali [Internet]. [consulté 28 Juin 2018]. Disponible sur: <http://www.igm-mali.ml/>
71. Ministère de la Santé : Direction Nationale de la Santé, Division Nutrition. Protocole de Prise en Charge Intégrée de la Malnutrition Aiguë au Mali ; 2011. [consulté le 26 Juin 2017]. Disponible sur : [https://www.humanitarianresponse.info/system/files/documents/file/Protocole\\_PECIMA\\_Mali%2023\\_06-2012VF.pdf](https://www.humanitarianresponse.info/system/files/documents/file/Protocole_PECIMA_Mali%2023_06-2012VF.pdf).
72. Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A, Haasen AB, Aissa RB. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli* : prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(3):571–582.
73. Konaté A, Dembélé R, Kagambèga A, Soulama I, Kaboré WAD, Sampo E, Cissé H, Sanou A, Serme S, Zongo S, Zongo C, Fody AM, Guessennd NK, Traoré AS, Gassama-Sow A, Barro N. Molecular Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children Less Than 5 Years of Age with Diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. Eur J Microbiol Immunol. 2017;7(3):220-8.
74. Tickell KD, Pavlinac PB, John-Stewart GC, Denno DM, Richardson BA, Naulikha JM, Kirera RK, Swierczewski BE, Singa BO, Walson JL. Impact of Childhood Nutritional Status on Pathogen Prevalence and Severity of Acute Diarrhea. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(5):1337-44.
75. Ferdous F, Das SK, Ahmed S, Farzana FD, Latham JR, Chisti MJ, Ud-Din AIMS, Azmi IJ, Talukder KA, Faruque ASG. Severity of Diarrhea and Malnutrition among Under Five-Year-Old Children in Rural Bangladesh. Am J Trop Med Hyg. 2013;89(2):223-8.

76. Jensen BH, Olsen KEP, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):614-30.
77. Iqbal NT, Sadiq K, Syed S, Akhund T, Umrani F, Ahmed S, Yakoob MY, Rahman N, Qureshi S, Xin W, Ma JZ, Hughes M, Ali SA. Promising Biomarkers of Environmental Enteric Dysfunction: A Prospective Cohort study in Pakistani Children. Sci Rep. 2018;8(1):2966.
78. Jones KD, Thitiri J, Ngari M, Berkley JA. Childhood malnutrition: toward an understanding of infections, inflammation, and antimicrobials. Food Nutr Bull. 2014;35(2\_suppl1):S64–S70.
79. Borresen EC, Stone C, Boré A, Cissoko A, Maiga A, Koita OA, Ryan EP. Assessing Community Readiness to Reduce Childhood Diarrheal Disease and Improve Food Security in Dioro, Mali. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 2016 [consulté 19 Mai 2018];13(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4924028/>
80. Revathy R, Benny B, Bandyopadhyay R, Liu J, Azharuddin KO M, Kang G, Houpt ER, Praharaj I. Enteropathogens and Gut Inflammation in Asymptomatic Infants and Children in Different Environments in Southern India. Am J Trop Med Hyg. 2018;98(2):576-80.
81. Jones KD, Thitiri J, Ngari M, Berkley JA, 2014. Childhood malnutrition: toward an understanding of infections, inflammation, and antimicrobials. Food Nutr Bull 35: S64–S70.
82. Platts-Mills JA, Taniuchi M, Uddin MJ, Sobuz SU, Mahfuz M, Gaffar SA, Mondal D, Hossain MI, Islam MM, Ahmed AS, Petri WA, Haque R, Houpt ER, Ahmed T. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6–23 mo in Bangladesh: a case-control study123. Am J Clin Nutr. 2017;105(5):1132-8.
83. Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. Int J Infect Dis. 2011;15(2):e136-9.
84. Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB, Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Braz J Microbiol. 2016;47:3-30.
85. Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 2006;55(10):1303-11.
86. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafán H, Uribe F, Eslava C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. The Lancet. 1991;337(8736):262-4.
87. Wanke CA, Schorling JB, Barrett LJ, Desouza MA, Guerrant RL. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. Pediatr Infect Dis J. 1991;10(10):746-51.

88. Yatsuyanagi J, Saito S, Sato H, Miyajima Y, Amano K-I, Enomoto K. Characterization of Enteropathogenic and Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Diarrheal Outbreaks. J Clin Microbiol. 2002;40(1):294-7.
89. Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1997;65(10):4135-45.
90. Huang DB, Nataro JP, DuPont HL, Kamat PP, Mhatre AD, Okhuysen PC, Chiang T. Enteroaggregative *Escherichia coli* Is a Cause of Acute Diarrheal Illness: A Meta-Analysis. Clin Infect Dis. 2006;43(5):556-63.
91. Aijuka M, Santiago AE, Girón JA, Nataro JP, Buys EM. Enteroaggregative *Escherichia coli* is the predominant diarrheagenic *E. coli* pathotype among irrigation water and food sources in South Africa. Int J Food Microbiol. 2018;278:44-51.
92. Roche JK, Cabel A, Sevilleja J, Nataro J, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Impairs Growth while Malnutrition Worsens EAEC Infection: A Novel Murine Model of the Infection Malnutrition Cycle. J Infect Dis. 2010;202(4):506-14.

# **Annexes**



## 7. Annexes :

### Annexe I : Composition de la gélose de Mac Conkey (BD DIFCO™)

COMPOSITION	Grammes/litre
Peptone de caséine	17
Peptone de viande	3
Sels biliaires	1,5
Cristal violet	0,001
Lactose	10
Rouge neutre	0,03
NaCl	5
Agar	13,5
pH	7,1

### Annexe II : Composition de la gélose d'Hektoen (BD DIFCO™)

Composition	Grammes/litre
Peptone	12
Extrait de levure	3
NaCl	5
Sels biliaires	9
Thiosulfate de sodium	5
Citrate de fer ammoniacal	1,5
Lactose	12
Salicine	2
Saccharose	12
BBT	0,002
Fuchsine acide	0,1
Agar	17
pH	7,5

**Annexe III : Composition de la gélose de Kligler Hajna (BD BBL™)**

<b>Composition</b>	<b>Grammes/litre</b>
Extrait de viande de bœuf	3
Extrait de levure	3
Peptone	20
NaCl	5
Citrate ferrique	0,3
Thiosulfate de sodium	0,3
Lactose	10
Glucose	1
Rouge de phénol	0,05
Agar	12
pH	7,4

**Annexe IV : Composition de la gélose Citrate de Simmons (OXOID CM0155)**

<b>COMPOSITION</b>	<b>Grammes/litre</b>
Sulfate de magnésium	0,2
Dihydrogénophosphate d'ammonium	0,2
Phosphate d'ammonium et de sodium	0,8
Citrate de sodium	2,0
Chlorure de sodium	5,0
Bleu de bromothymol	0,08
Agar	15,0
pH	7,0 ± 0,2

**Annexe V : Composition du milieu Urée-Indole (BD DIFCO™)**

<b>Composant</b>	<b>Quantité (g/l)</b>	<b>Rôle</b>
Urée	2	Lecture d'un caractère biochimique (substrat de l'uréase)
L-tryptophane	0,3	Lecture d'un caractère biochimique (acide aminé, permet la recherche de l'indole et de la TDA)
Chlorure de sodium	0,5	Source de sels minéraux maintien de la pression osmotique
Dihydrogénophosphate potassium	de 0,1	
Hydrogénophosphate potassium	de 0,1	
Rouge de phénol	0,0025	Indicateur de PH
pH	7	

**Annexe VI : Composition de la gélose MR-VP Médium (OXOID CM0043)**

<b>Composition</b>	<b>Grammes/litre</b>
Peptone	5
Glucose	5
Tampon phosphate	5
pH	7,5 ± 0,2

**Fiche signalétique et résumé :**

- Fiche signalétique :

**Non :** DIASSANA

**Prénom :** Abraham

**Telephone :** 79014542/64743277

**E-mail :** conpadoc@gmail.com

**Titre :** Identification des souches d'*Escherichia coli* en rapport avec la malnutrition dans les selles à Dioro

**Nationalité :** Malienne

**Année Universitaire :** 2017-2018

**Ville de soutenance :** Bamako-Mali

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

**Secteur d'intérêt :** Bactériologie et Parasitologie Moléculaire, Santé publique, Agriculture.

- Résumé :

Les souches d'*E. coli* ayant acquis des facteurs de virulence constituent les souches pathogènes et sont regroupées en pathovars. Les pathovars EAEC, EHEC, EIEC, EPEC, ETEC sont regroupés sous le nom des *E. coli* diarrhéagéniques.

Notre étude réalisée au laboratoire de biologie moléculaire appliquée (LBMA) à Bamako a porté sur 50 enfants suivis durant 6 mois et sur un total de 269 échantillons de selles avait pour objectif de mettre en place un système d'identification de ces 5 pathotypes à partir des selles et d'établir un lien avec la malnutrition. Cette démarche a été réalisée d'une part selon les caractères morphologiques et biochimiques et d'autre part selon les caractères moléculaires.

Un total de 323 échantillons de selles non diarrhéiques et 30 échantillons de selles diarrhéiques a été recueilli au cours de l'étude. Ces échantillons ont étéensemencés sur les géloses Mac Conkey et Hektoen pour l'isolement d'*E. coli*. et soumis à une série de tests biochimiques pour l'identification d'*E. coli*. L'ADN des colonies pures identifiées comme des souches d'*E. coli* a été extrait par choc thermique et les colonies pures ont été conservées dans un bouillon nutritif et gardées à -80 °C.

Les résultats de la PCR multiplexe ont permis d'affirmer la présence de 7 pathovars d'*E. coli* dans les échantillons de selles diarrhéiques et 43 pathovars dans les échantillons de selles non diarrhéiques. Ce qui nous fait un total de 50 pathovars isolées.

Les données anthropométriques ont permis de déterminer les z-scores poids/taille en utilisant la table poids/taille de l'OMS. L'analyse de ces paramètres montre que 15 enfants ont été malnutris au cours de l'étude.

La fréquence des épisodes de diarrhée a été plus élevée chez les enfants malnutris. La prévalence des souches d'*E. coli* a été plus élevée dans les selles diarrhéiques et les souches pathogènes d'*Escherichia coli* ont été présentes chez la plupart des enfants qui ont été malnutris durant l'étude.

La malnutrition peut entraîner un affaiblissement du système immunitaire rendant les enfants vulnérables aux infections. La consommation du son de riz par les enfants pourrait être un moyen efficace dans la prévention de la diarrhée et de la malnutrition.

**Mots clés :** malnutrition, *E. coli*, gènes, souches, pathovars, diarrhée, son de riz.

- Abstract :

Some Strains of *E. coli* having acquired virulence factors constitute of pathogenic strains and are grouped into pathovars. Pathovars EAEC, EHEC, EIEC, EPEC, ETEC are grouped under the name of *E. coli* diarrheagenic.

We conducted a study that took place at the Laboratory of Applied Molecular Biology (LBMA) in Bamako. Our experiment was focused on 50 children who were followed for 6 months. We gradually collected a total stool samples of 353 which was aim to set up a system of identification of these 5 pathotypes and to observe their link with malnutrition. This approach was carried out on the one hand according to the morphological and biochemical characters and on the other hand according to the molecular characters.

During our study, a total of 323 non-diarrheal stool specimens and 30 stool samples were collected. These samples were seeded on a Mac Conkey and Hektoen plates for isolation of *E. coli*. These plates were subjected to a series of biochemical tests for the identification of *E. coli*. Then the DNA from pure colonies suspected of *E. coli* was extracted by heat shock and the pure colonies were stored in nutrient broth and stored at -80 °C.

The data collected from the multiplex PCR revealed the presence of 07 pathovars of *E. coli* in diarrheal stool samples and 43 pathovars in non-diarrheal stool specimens. This demonstrated a total of 50 pathovars isolated from a total of 353 stool samples.

Anthropometric data data made it possible to determine the z-scores weight / height using WHO weight/height table. Analysis of these parameters shows that 15 children were malnourished during the study.

The frequency of diarrhea episodes was higher in malnourished children. The prevalence of *E. coli* was higher in feces diarrheal and pathogen strains of *E. coli* were present at most of children who have been malnourished during the study.

Malnutrition can lead to the weakening of the immune systems, hence making children vulnerable to infections. The consumption of rice bran by children could be an effective means in the prevention of diarrheal and malnutrition.

Children who have been malnourished have had many more episodes of diarrhea than "healthy" children.

## 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 !