



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE
BAMAKO

Faculté de Pharmacie

FAPH



Année Universitaire
2017-2018

N°/P

THESE

**Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes
de résistance des souches d'*Escherichia coli*
isolées des selles, chez les enfants de 0 à 59
mois dans quatre CSComs du district de
Bamako**

Présentée et soutenue publiquement le 17/02/2018
Devant le jury de la faculté de pharmacie

Par

M. Alhadji Alassane DICKO

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie
(DIPLOME D'ETAT)

JURY

Président : Professeur agrégé Abdoulaye Djimdé
Membre : Docteur Karamoko Sacko
Membre : Docteur Sarata Doumbia
Co-directeur : Docteur Ibréhima Guindo
Directeur : Maître de conférences agrégé Flabou Bougoudogo

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

**FACULTE DE PHARMACIE
ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018**

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE - Professeur

VICE-DOYEN : M. Ababacar I. MAIGA - Professeur

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY Administrateur civil

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN Contrôleur des finances

PROFESSEURS HONORAIRES

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie générale & minérale
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Boulkassoum	HAIDARA	Législation
M. Moussa	HARAMA	Chimie organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Organique
M. Alou A	KEITA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

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

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye	TOURE	Entomologie Moléculaire-Médicale
M. Abdoulaye	DJIMDE	Microbiologie-Immunologie
M. Akory AG	IKNANE	Santé publique/Nutrition
M. Ousmane	KOITA	Parasitologie-Moléculaire
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Ibrehima	GUINDO	Bactériologie virologie
M. Kassoum	KAENTAO	Santé Publique/Bio statistiques
M. Issaka	SAGARA	Santé Publique/Bio statistiques

Mme Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique/Bio statistiques

4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Saaou	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. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
Mme Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
M.Yaya	GOITA	Biochimie clinique
Mme Merepen dit Agnes	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEITA	Santé publique/Santé environnement
Mme.N'Deye Lallah Nina	KOITA	Nutrition
M. Birama Apho	LY	Santé publique
M. yacouba	MAIGA	Bio statistique
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
Mme. Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/ DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saibou	MAIGA	Législation
Mme Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

Néant - -

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Moussa	SANOGO	Gestion
M. Yaya	COULIBALY	Législation
Mme Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE 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. Sekou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation

M. Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
M. Ahmed	MAIGA	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 Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie chimique
M. Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

M. Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER
M. Benoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Dominique patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
M. Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Abdourahamane	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

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées des selles, chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

Je rends grâce à Allah, le tout miséricordieux, le très miséricordieux et à son envoyé le prophète Mohammad paix et salue soit sur lui...

Remerciements

Au **Professeur Abdoulaye DJIMDE**, PharmD, PhD, FAAS, Professeur Agrégé Parasitologie - Mycologie ; Chef de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance au MRTC ; Directeur de DELGEME.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en acceptant la présidence de notre jury de thèse. Recevez ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Au **Professeur Flabou BOUGOUDOGO**, notre Directeur de thèse. Maître de conférences Agrégé de bactériologie et virologie à la faculté de pharmacie et de médecine ; Responsable de l'enseignement de la bactériologie et de la virologie à la faculté de pharmacie ; Directeur de l'INRSP de 2002 à 2012 ; Officier de l'ordre du mérite de la Santé.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos conseils précieux, de votre écoute permanent, et surtout de votre patience. Nous sommes reconnaissants de la confiance que vous nous avez accordée et des discussions enrichissantes que nous avons eues. Nous tenons à vous assurer toute notre admiration et notre respect.

Au **Docteur Seydou DIARRA**, chef de service de bactériologie virologie INRSP, recevez toute l'expression de notre reconnaissance pour nous avoir proposé ce sujet de recherche et, pour votre dynamisme et vos compétences scientifiques qui nous ont permis de mener à bien cette étude. Nous tenons à vous assurer toute notre admiration et notre respect.

Au **Docteur Ibrehima GUINDO**, Pharmacien biologiste au service de bactériologie - virologie INRSP ; Responsable du laboratoire des IST/VIH de l'INRSP ; Maître-assistant de Bactériologie Virologie à la faculté Pharmacie de Bamako.

Notre maître et co-directeur, pour nous avoir, il y a quelques années, ouvert les voies de la microbiologie et de la recherche. Nous vous remercions, d'une part, de la confiance que vous nous avez accordée depuis le début de nos stages à l'INRSP et, d'autre part, d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'encadreur. Nous sommes reconnaissants pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et nous tenons à vous assurer tout notre respect et toute notre amitié.

Au **Docteur Sarata DOUMBIA**, Docteur en Médecine générale de la FMOS : Diplôme d'état ; Membre du réseau des femmes médecins du Mali ; Médecin traitant à l'ASACOSAB1.

Nous vous remercions d'avoir contribué à mener à bien ce projet en participant au comité d'exécution et d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Trouvez ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Au **Docteur Karamoko SACKO**, Maître-assistant à la FMOS ; Diplômé interuniversitaire en pathologie fonctionnelle digestive de l'enfant ; Praticien hospitalier.

Nous sommes reconnaissants de l'honneur et du plaisir que vous nous avez fait en participant au jury de notre thèse. Recevez ici nos sincères remerciements et notre respect.

Que chacun d'entre vous soit ici vivement remercié de nous avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury et le plaisir d'assister à ma soutenance. Recevez ici, l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'attention et l'intérêt que vous avez portés à ce travail.

Je remercie...

Toute l'équipe du service de bactériologie-virologie de l'INRSP, Dr I. GUINDO, Dr A. DIALLO, Mr I. CISSE, la Maman Mme Traore H. SAMAKE et tous les internes (FID, Cisse, Aicha, Sangare, Traore, Dieng, Samake, Guedjouma, M. le président NYK) ainsi que les aînés Diarra et Gafou, vous m'avez permis, par votre aide, votre soutien et votre dévouement, de mener à bien ce projet de recherche.

Le personnel de la Pharmacie Kindia, Dr M. SAMAKE, Dr I. KANE, B. DEMBELE, A. KANE, Mama, pour votre soutien et votre compréhension qui m'ont permis de travailler librement sur cette étude.

Un travail scientifique ne saurait se réduire à une réalisation isolée. Que chacun d'entre vous soit ici très sincèrement remercié d'avoir contribué à l'aboutissement de ce projet de recherche.

Je remercie...

Mes parents Alassane A Dicko et Kadidia Foune Ibrahim, pour votre amour, votre persévérance (avec un enfant, je le conçois, quelque peu turbulent) et votre soutien depuis toujours. Trouvez ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour ;

Dramane Coulibaly et Fatalmoudou Maiga, pour m'avoir accueilli à Bamako depuis mon Bac, votre patience, votre encadrement précieux et inestimable, vos conseils, vos convictions respectives, votre dynamisme et votre aide pour réussir loin des parents que vous avez été pour moi, que Dieu vous garde ;

Mes sœurs, Fatouma, Oumou, Kaga, Didia, Hawoye et Feity pour votre aide et vos précieux conseils ainsi que pour la complicité qui nous unit ;

Mes cousins et cousines, Mahal, Hamane, Alto, Fatouma et Nana, pour votre soutien permanent, je suis fier d'être de la famille.

Aminata Maiga, pour ta présence à mes côtés dans les bons comme dans les moments plus difficiles, tes encouragements, ta compréhension et, tout simplement ton amour ;

... sans eux, rien n'aurait été possible... je leur dédie cette thèse.

Toute ma famille et tous mes amis qui me sont chers.

Enfin, ce projet de deux ans n'aurait pu aboutir sans votre soutien. Que chacun d'entre vous soit ici de tout cœur remercié d'avoir participé de près ou de loin à cette aventure.

Table des matières

Remerciements	vi
Table des matières	x
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures	xv
Liste des sigles et abréviations	xvi
Introduction	1
Objectifs	3
Objectif général	3
Objectifs spécifiques	3
I. PREMIERE PARTIE : Etude bibliographique	4
I.1 CHAPITRE I : Vue d'ensemble des bactéries enteropathogènes	4
I.1.1 Définition	4
I.1.2 Les différentes bactéries entéropathogènes	4
I.1.3 Aspects moléculaires de leur virulence : les îlots de pathogénicité.....	4
I.1.3.1 Définition des îlots de pathogénicité	4
I.1.3.2 Caractéristiques des îlots de pathogénicité.....	5
I.1.4 Diagnostic dans les matières fécales.....	5
I.1.4.1 La coproculture.....	5
I.1.4.2 Diagnostic moléculaire par PCR	6
I.1.4.3 Autres méthodes de diagnostic	7
I.1.4.3.1 Le diagnostic antigénique.....	7
I.1.4.3.2 La Culture cellulaire	7
I.2 CHAPITRE II : ETUDE MONOGRAPHIQUE	8
<i>Escherichia coli</i>	8
I.2.1 Caractères généraux	8
I.2.1.1 Caractères morphologiques et culturels	8
I.2.1.2 Caractères biochimiques.....	8
I.2.1.3 Caractères antigéniques	9
I.2.1.3.1 Antigènes somatique O	9
I.2.1.3.2 Antigènes de surface ou d'enveloppe K.....	9
I.2.2 Mode de transmission	10
I.2.2.1 Transmission alimentaire.....	10

I.2.2.2	Transmission par le contact direct avec les animaux de ferme et leur environnement.....	10
I.2.2.3	Transmission interhumaine	11
I.2.2.4	Transmission hydrique	11
I.2.3	Génétique et pathogénicité.....	12
I.2.3.1	Génome d'Escherichia coli.....	12
I.2.3.2	La plasticité génomique d'Escherichia coli.....	13
I.2.3.3	Comparaison entre le génome des souches pathogènes et celui des souches commensales	13
I.2.3.4	La diversité génétique et les éléments génétiques mobiles	13
I.2.3.4.1	La diversité génétique	13
I.2.3.4.2	Les éléments mobiles de pathogénicité.....	14
I.2.3.5	Pouvoir pathogène	15
I.2.3.5.1	Les facteurs de virulence	15
I.2.3.5.1.1	Les facteurs de virulence potentiels	16
I.2.3.5.1.2	Shiga toxine (Stx) d'Escherichia coli:.....	17
I.2.3.5.1.3	Les facteurs d'adhésion.....	18
I.2.3.5.1.4	L'entérohémolysine d'Escherichia coli	18
I.2.3.5.2	Le support génétique de la virulence.....	18
I.2.3.5.3	Les gènes codant les facteurs de virulence.....	19
I.2.3.6	Les types de plasmide des Escherichia coli.....	20
I.2.4	Antibiorésistance	21
I.2.4.1	Résistance intrinsèque et résistance acquise.....	21
I.2.4.2	Mécanismes et transfert de résistance	21
I.2.4.3	Support génétique de l'antibiorésistance.....	22
I.2.4.4	Gènes de résistance aux antibiotiques	24
I.2.4.5	Virulence et antibiorésistance.....	25
I.2.5	Épidémiologie.....	25
I.2.6	Maladies cliniques	26
I.2.6.1	Gastro-entérite	27
I.2.6.1.1	E. coli entérotoxigène.....	29
I.2.6.1.2	E. coli enteropathogène	30
I.2.6.1.3	E. coli Enteroaggregative	30
I.2.6.1.4	E. coli producteur de Shiga Toxine	31
I.2.6.1.5	E. coli Enteroinvasive.....	32
I.2.6.2	Infections extra-intestinales.....	33

I.2.6.2.1	Infection urinaire	33
I.2.6.2.2	Méningite néonatale	33
I.2.6.2.3	Septicémie	33
I.2.7	Diagnostic des infections à EHEC / ETEC.....	33
I.2.7.1	Prélèvements.....	34
I.2.7.2	Mise en évidence des toxines et des gènes de virulence	34
I.2.7.2.1	Effet cytopathogène.....	34
I.2.7.2.2	Méthodes moléculaires.....	35
I.2.7.3	Tests immunologiques.....	35
I.2.7.4	Isolement et caractérisation des souches	37
I.2.7.5	Sérodiagnostic	38
I.2.8	Traitement des infections à EHEC.....	39
I.2.8.1	Traitement préventif	39
I.2.8.2	Les antibiotiques au stade de l'infection gastro-intestinale.....	39
I.2.8.3	Traitements de demain	39
I.2.8.3.1	Traitements neutralisant les toxines Stx	39
I.2.8.3.2	Anticorps monoclonaux humanisés anti-Stx.....	39
I.2.8.3.3	Anticorps monoclonaux inhibant l'activation du complément	39
II.	DEUXIEME PARTIE : Étude expérimentale.....	40
II.1	CHAPITRE I : Matériel et Méthodes	40
II.1.1	Matériel	40
II.1.1.1	Matériels biologiques.....	40
II.1.1.2	Matériel d'étude de laboratoire.....	40
II.1.2	Méthodes	40
II.1.2.1	Cadre, type et durée de l'étude	40
II.1.2.2	Critères d'inclusion et d'exclusion	40
II.1.2.3	Population d'étude	40
II.1.2.4	Définition de la diarrhée :	40
II.1.2.5	Taille de l'échantillon	40
II.1.2.6	Collecte des données.....	41
II.1.2.7	Prélèvement et transport des échantillons.....	41
II.1.2.8	Coproculture standard.....	41
II.1.2.9	Extraction de l'ADN génomique total	41
II.1.2.9.1	Remise en culture des souches	41
II.1.2.9.2	Extraction par thermolyse.....	41

II.1.2.10	Définition des témoins et des amorces utilisées	42
II.1.2.10.1 Définition des souches de référence et du témoin négatif	42
II.1.2.10.2 Définition des amorces utilisées pour l'étude	42
II.1.2.10.2.1	Détection des gènes de virulence	42
II.1.2.10.2.2	Détection des intégrons.....	42
II.1.2.10.2.3	Recherche des phénotypes et des gènes de résistance aux antibiotiques	42
II.1.2.11	. Préparation du mélange réactionnel.....	45
II.1.2.12	. Paramétrage du thermocycleur	45
II.1.2.13	. Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	46
II.1.2.14	. Visualisation des produits de PCR.....	47
II.1.2.15	. Traitement et analyse des données.....	47
II.1.2.16	. Considérations éthiques	47
II.1.2.16.1	Aprobation :	47
II.1.2.16.2	Confidentialité et anonymat :	47
II.1.2.16.3	Consentement éclairé :	47
II.1.2.16.4	Risques et bénéfices :	47
II.1.2.16.5	Justice :	48
II.1.2.16.6	Gestion des déchets :	48
III.	Résultats	49
IV.	Discussion	65
V.	Conclusion	69
VI.	Recommandations	70
VII.	Références	71
VIII.	Annexes.....	80

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des bactéries entéropathogènes	4
Tableau II : Caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i> (18).....	9
Tableau III : Facteurs de virulence spécialisés associés à <i>Escherichia coli</i>	12
Tableau IV : Les principaux types de plasmide rencontrés dans l' <i>Escherichia coli</i> (33).	20
Tableau V : Gastro-entérite causée par <i>Escherichia coli</i>	28
Tableau VI : Tests immunologiques de détection des EHEC dans les selles ou le bouillon d'enrichissement (20).....	36
Tableau VII : Liste des amorces pour la recherche des gènes de virulence d' <i>E. coli</i> par PCR	43
Tableau VIII : Liste des amorces pour la recherche des intégrons dans les isolats de <i>E. coli</i>	43
Tableau IX : Les facteurs de pathogénicité en fonction des pathovars d' <i>E. coli</i>	44
Tableau X : Liste des amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance de <i>E. coli</i> aux antimicrobiens par PCR.....	44
Tableau XI : Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex	45
Tableau XII : Programme de la PCR pour détecter les facteurs de virulence	46
Tableau XIII : Programme de la PCR pour détecter les gènes de résistance.....	46
Tableau XIV : Caractéristiques sociodémographiques des patients	49
Tableau XV : Aspects thérapeutiques avant le prélèvement.....	50
Tableau XVI : Répartition de la population selon les signes observés associés à la diarrhée.	50
Tableau XVII : Répartition de la population selon les signes non associés à la diarrhée observée.....	51
Tableau XVIII : Aspects des selles	52
Tableau XIX : Résultat de la culture bactérienne	52
Tableau XX : Les serovars d' <i>E. coli</i> définis par agglutination	53
Tableau XXI : Résultat de la culture en fonction des saisons de prélèvement, des sites, de l'âge et du mode d'approvisionnement en eau de boisson.....	54
Tableau XXII : Sensibilité des souches d' <i>E. coli</i> aux antimicrobiens (faire la liste par famille d'antibiotiques, refaire la figure aussi en fonction de la nouvelle disposition).....	56
Tableau XXIII : Résultats de la recherche des gènes des enterotoxines	57
Tableau XXIV : Résultats de la recherche des gènes des adhésines.....	57
Tableau XXV : Résultats de la recherche des gènes de résistance (intégrons).....	58
Tableau XXVI : Résultats de la recherche des gènes de résistance (ATB isolement).....	59
Tableau XXVII : Représentation des facteurs de pathogénicité en fonction des pathovars d' <i>E. coli</i> . ..	60
Tableau XXVIII : Représentation des facteurs de pathogénicité en fonction des signes cliniques.....	61
Tableau XXIX : Répartition des facteurs de virulence positifs selon les signes associés.....	62
Tableau XXX : Répartition des facteurs de virulence positifs selon les sites	63
Tableau XXXI : Répartition des facteurs de virulence positifs selon les tranches d'âges.....	64

Liste des figures

Figure 1 : Démarche diagnostique d'une coproculture classique (15).....	6
Figure 2 : <i>Escherichia coli</i> sous microscope électronique (19).....	8
Figure 3 : Cycle de vie d' <i>Escherichia coli</i> (21)	10
Figure 4 : Les voies de contamination par l' <i>Escherichia coli</i> (18)	11
Figure 5 : Les éléments génétiques mobiles (22).	15
Figure 6 : Les gènes codant les principaux facteurs de virulence connus portés par les éléments mobiles du génome (22).....	19
Figure 7 : Sites de colonisation des <i>Escherichia coli</i> pathogènes (65).....	26
Figure 8 : Incidence des entérobactéries associées à une bactériémie. (Data courtesy Barnes-Jewish Hospital, St Louis, Mo.)	26
Figure 9 : Diagnostic d'une infection à EHEC. D'après (67).	34
Figure 10 : Morphologie des colonies d' <i>E. coli</i> O157:H7 sur les milieux SMAC, SMAC-CT et STEC.	37
Figure 11 : Pulsotypes d' <i>E. coli</i> O104:H4 (digestion enzymatique par NotI).	37
Figure 12 : Répartition des souches isolées à la culture en fonction des tranches d'âges	53
Figure 13 : Répartition des signes cliniques associés à la diarrhée	55
Figure 14 : Répartition des signes cliniques non associés à la diarrhée.	55
Figure 15 : Pourcentage de résistance des souches de <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis des antibiotiques testés	57
Figure 16 : Résultat d'une PCR eae (Source: INRSP)	58
Figure 17 : Résultat d'une PCR tem (Source: INRSP).....	59
Figure 18 : Résultat d'une PCR qnrB (Source: INRSP).....	60

Liste des sigles et abréviations

°C	: Degré Celsius
A + T	: Adénine et Thymine
A/E	: Attachement/effacement
AAF	: Aérobie anaérobie facultatif
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMPc	: l'adénosine mono phosphate cyclique
API	: Analytical profile index
ARN	: Acide ribonucléique
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	: Acide ribonucléique de transfert
ASACOBOUL1	: Association de sante communautaire de Boukassoumbougou
ASACOSAB1	: Association de sante communautaire de Sabalibougou
ASACOSIK1	: Association de sante communautaire de Sikoroni
ASACOTOQUA	: Association de sante communautaire de Torokorobougou et Quartier-Mali
ATB	: AntibioGramme
BCP	: Bromocrésol pourpre
BEP	: Bactérie entéro-pathogène
BET	: Bromure d'éthidium
BFP	: Bundle forming pili
BGN	: Bacilles à Gram négatif
BLLS	: Bêta-lactamases à large spectre
BLSE	: Bêta-lactamase à spectre étendu
BMR	: Bactéries multi résistantes
C + G	: Cytosine et Guanine
C3G	: Céphalosporine de 3 ^{ème} génération
CA-SFM	: Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
/CF	: Facteur de colonisation
cGMP	: Guanosine monophosphate cyclique
CNS	: système nerveux central
CSCom	: Centre de Santé Communautaire
dNTPs	: Désoxyribonucléotides triphosphates
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EAF	: EPEC adherence factor
EAST	: toxine a poids moléculaire faible
Eau ppi	: Eau pour préparation injectable
ECAD	: <i>E. coli</i> à adhésion diffuse ou DAEC (diffusely adherent <i>E. coli</i>)
ECEAg	: <i>E. coli</i> entéroagréatif ou EAggEC (enteroaggregative <i>E. coli</i>)
ECEH	: <i>E. coli</i> entérohémorragique ou EHEC (enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>)
ECEI	: <i>E. coli</i> entéroinvasif ou EIEC (enteroinvasive <i>E. coli</i>)
ECEP	: <i>E. coli</i> entéro-pathogène ou EPEC (enteropathogenic <i>E. coli</i>)
ECET	: <i>E. coli</i> entérotoxinogène ou ETEC (enterotoxinogen <i>E. coli</i>)
EDTA	: Aide Ethylène diamine tétra acétique
EFSA	: European Food Safety Authority
Ehly	: Entero-hémolysine
EIA	: Enzyme ImmunoAssay

ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EMB	: Eosine bleu de méthylène
F	: Forward
Fim	: Fimbriae
Gb3	: globotriaosylceramide
GE	: Gastro-enterite
GI	: Gastro-intestinal
GLISA	: Gold Labelled ImmunoSorbent Assay
GLU	: Glucose
H/F	: Homme/Femme
H ₂ O	: D'hydroxyde d'oxygène
H ₂ S	: Sulfate d'hydrogène
HlyA	: Hemolysine
I	: Intermédiaire
Ig	: Immunoglobuline
IL	: Interleukine
INRSP	: Institut National de Recherche en Santé Public
Int	: Intégrase
ipaH	: Invasion plasmid antigen H
IS	: Sequences d'insertion
Kb	: Kilobase
Km ²	: Kilomètre carré
LAC	: Lactose
LEE	: Locus of enterocyte effacement
LPS	: Lipopolysaccharide
LT	: Thermolabile
M	: Marqueurs de poids moléculaire
MAT	: Micro Angiopathie Thrombotique
MgCl ₂	: Chlorure de magnésium
MH	: Mueller-Hinton
mM	: Mili molaire
NG	: Non groupable
NMEC	: <i>E. coli</i> à l'origine de méningites néonatales
NR	: Non renseigné
OIA	: Optical ImmunoAssay
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ORF	: Open Reading Frame
PAIs	: Pathogenicity-Associated Island
Pap	: Pyelonephritis associated pilus
Pb	: Paires de bases
PBS	: Phosphate buffer saline
PCR	: Polymerase chain reaction
PFGE	: Pulsed-field gel electrophoresis
PvVIH	: Personne vivante avec le VIH
R	: Reverse
Réf	: Référence
REMENTA	: Réseau pour la Recherche sur les Maladies Entériques à potentiel épidémique en Afrique de l'Ouest
REMIC	: Référentiel en microbiologie médicale
Rtx	: Repeats in toxin

S	: Sensible
SAT	: Secreted autotransporter toxin
SHI	: Shigella Pathogenicity Island
SHU	: Syndrome hémolytique et urémique
SLT	: Shiga like toxine
SMAC	: Mac Conkey Sorbitol
SMAC-CT	: Mac Conkey Sorbitol – CT (Céfixime - Tellurite)
SOP	: Mode opératoire standard
Spp	: Espèce
SS	: Salmonella-Shigella
ST	: Thermostable
STEC	: <i>E. coli</i> producteur de shigatoxines
STX	: Shigatoxine
Sul	: Sulfamide
T3SS	: Type Three Secretion System
TAE	: Tris acétate EDTA
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris borate EDTA
TCBS	: Thiosulfate-citrate-bile-saccharose
Tet	: Tétracycline
TIAC	: Toxi-infections alimentaires collectives
Tir	: Translocated intimin receptor
Tn	: Transposons
TNF	: Facteur de nécrose tumorale
TtrB	: Tetrathionate reductase subunit B
UNICEF	: Fonds des Nations unies pour l'enfance
UPEC	: <i>E. coli</i> uropathogène
UTI	: Urinary tract infection
V. cholerae	: Vibrio cholerae
VAT	: Vacuolating
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
VIH +	: Virus de l'immunodéficience humaine positif
VT	: Verotoxine
VTEC	: <i>E. coli</i> produisant des verocytotoxines
WHO	: World Health Organization
µl	: Microlitre
µm	: Micromètre

Introduction

Les maladies entériques représentent la 2^{ème} cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans, avec 2,5 milliards de cas estimés dans le monde, conduisant à 1,5 millions de morts chaque année (1). Cette situation est critique en Afrique Subsaharienne où les maladies entériques sévissent sur les modes endémiques ou même épidémiques avec des taux de mortalité encore très élevés ; cela malgré les efforts déployés par l'UNICEF et l'OMS avec le programme de lutte contre les maladies diarrhéiques (2). Au nombre des agents impliqués dans ces affections, les bactéries entéropathogènes dont *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Shigella* occupent souvent une place de choix tant par leur fréquence que par la gravité des affections qu'ils provoquent.

Les diarrhées aiguës sont plus graves dans les pays en développement (Afrique, Asie...) car elles surviennent le plus souvent sur un terrain fragilisé par la malnutrition (3). Plus d'un tiers des lits des services de pédiatrie de ces pays sont occupés par des malades diarrhéiques (4).

Selon l'OMS, en Asie du Sud-Est et en Afrique, jusqu'à 8,5% et 7,7% de tous les décès respectivement sont dus à la diarrhée.

E. coli est considéré comme un colonisateur normal de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animales. La majorité des souches d'*E. coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches d'*E. coli* dites entérohémorragiques (EHEC). Ces dernières provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Régulièrement, des souches d'EHEC sont la cause d'intoxications alimentaires via la consommation de produits animaux mal cuits ou consommés crus. Les fruits et les légumes frais, ayant été en contact avec ces souches peuvent être également à risque (5).

Au Mali de nombreuses études ont montré l'implication des sérotypes d'*E. coli* dans les diarrhées infantiles (6).

Le Mali est un pays continental avec une superficie de 1.241.231 Km². La population était estimée à 14.853.752 habitants en 2009 (7). Le pays compte 65 districts sanitaires (8). La situation sanitaire est marquée par des taux de mortalité et de morbidité élevés surtout dans la tranche d'âge de 0 à 5 ans. Les principales pathologies en causes sont le paludisme, la malnutrition, les affections des voies respiratoires supérieures, la rougeole et les maladies diarrhéiques (8).

La diarrhée est l'une des maladies infantiles les plus meurtrières au Mali. Le nombre total de décès chez les enfants de moins de cinq ans dû à la diarrhée en 2010 était de 17.977 (6). En 2012, le pays a enregistré 228.108 cas avec une fréquence plus élevée à Sikasso (35.096 cas) et à Bamako (42.686 cas) (6). Elle est responsable d'environ 14% des décès d'enfants de moins de cinq ans.

Les agents pathogènes responsables de diarrhée peuvent être d'origine bactérienne, virale, parasitaire ou fongique.

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

A l'instar des autres pays en développement, les gastroentérites infectieuses demeurent un problème de santé publique au Mali. *Salmonella* spp., *Shigella* spp. et *Escherichia coli* font partie des causes majeures de ces pathologies.

La coproculture, méthode de diagnostic habituelle utilisée telle qu'elle est pratiquée par les laboratoires de bactériologie du pays ne permet pas de confirmer l'implication de ces pathogènes lors des gastroentérites. Elle repose en réalité sur un diagnostic direct, c'est-à-dire la mise en évidence d'agents bactériens dans les selles. Beaucoup de bactéries commensales peuplent le tractus digestif, les germes retrouvés à la culture ne sont donc pas forcément pathogènes. Les techniques moléculaires quant à elles permettent de mettre en évidence les facteurs de pathogénicité de ces germes donc leur implication dans la pathologie.

La présente étude en droite ligne avec les objectifs du programme de recherche du REMENTA, a pour objectif de déterminer la fréquence d'*E. coli* pathogènes grâce à l'utilisation des méthodes moléculaires de diagnostic.

Devant une telle situation, on se demande ; quelle serait d'un point de vue moléculaire les caractéristiques des souches d'*E. coli* responsables de gastro-entérites chez les enfants de 0-5 ans vus dans quatre CSComs du district de Bamako ?

Disposant de peu de facteurs de pathogénicité, les souches d'*Escherichia coli* dans la population malienne devienne commensales précocement.

Objectifs

Objectif général

Déterminer la fréquence d'*E. coli* responsable de gastroentérites chez les enfants de 0 à 59 mois.

Objectifs spécifiques

- Identifier les pathovars d'*E. coli* dans les diarrhées chez les enfants de 0 à 59 mois ;
- Identifier le profil moléculaire (facteurs de virulence, gènes de résistance aux antibiotiques) de ces *E. coli* ;
- Analyser le profil des souches isolées en fonction des caractéristiques sociodémographiques des patients ;
- Analyser le profil des souches isolées en fonction des caractéristiques cliniques des patients.

I. PREMIERE PARTIE : Etude bibliographique

I.1 CHAPITRE I : Vue d'ensemble des bactéries enteropathogènes

I.1.1 Définition

Le mot « entéropathogène » dérive du grec <entéron> : intestin, <pathos> : maladie et <gennân> : engendrer (9). Les bactéries entéropathogènes sont les bactéries capables d'entraîner une entérite, c'est à dire une inflammation de la muqueuse intestinale. Cette entéropathie s'accompagne le plus souvent d'une atteinte de l'estomac (gastro-entérite) ou du côlon (entérocolite).

I.1.2 Les différentes bactéries entéropathogènes

On distingue les bactéries toxigènes et les bactéries invasives (Tableau 1). Les bactéries toxigènes sont le plus souvent responsables de syndrome cholériforme : la toxine peut être ingérée avec un aliment ou le plus souvent sécrétée sur place au niveau de l'intestin grêle ; les selles sont abondantes, fréquentes, aqueuses sans polynucléaires ni mucus. Quant aux bactéries invasives, elles sont responsables de syndrome dysentérioriforme : après adhésion et envahissement de l'épithélium intestinal, la bactérie entraîne des selles glaireuses, muco-sanglantes avec le plus souvent présence de polynucléaires dans les selles.

Tableau I : Classification des bactéries entéropathogènes

Bactéries entéro-toxigènes	Bactéries entéro-invasives
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Salmonella</i> spp.
EPEC, EPEC, EHEC, EAEC, EADEC	<i>Shigella</i> spp.
<i>Aeromonas</i> spp	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	EIEC
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Bacillus fragilis</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	

I.1.3 Aspects moléculaires de leur virulence : les îlots de pathogénicité

I.1.3.1 Définition des îlots de pathogénicité

Les bactéries pathogènes et non pathogènes diffèrent par l'expression de facteurs de virulence. Les gènes codant pour ces différents facteurs sont souvent regroupés en « blocs » appelés îlots de pathogénicité, en anglais : pathogenicity-associated islands (PAIs), localisés

soit sur le chromosome, soit sur un plasmide (10). Les PAIs regroupent en général les gènes des facteurs qui suffisent à rendre la bactérie capable d'un comportement pathogène.

Le concept d'îlot de pathogénicité a été introduit pour la première fois en 1980 par Jörg HACKER et ses collaborateurs en Allemagne ; ils avaient alors à l'époque décrit le premier PAI bactérien chez une souche d'*E. coli* isolée du tractus urinaire (souche 536) (11).

I.1.3.2 Caractéristiques des îlots de pathogénicité

Près d'une dizaine de spécificités générales sont prises en compte pour attribuer le nom d'îlot de pathogénicité à une séquence génomique. De toute évidence, un PAI comporte un ou plusieurs gènes de virulence, dans le cas échéant il s'agit plutôt d'un îlot génomique ou métabolique. Aussi, un PAI se retrouve uniquement chez la souche pathogène et n'est pas retrouvé chez les autres membres non pathogènes de l'espèce. Toutefois, ces îlots sont parfois instables et peuvent être perdus *in vitro* ou lors de l'infection (11). La grandeur des PAIs peut varier entre 10 et 200 kb ; de plus, le pourcentage en guanine et cytosine (G+C) diffère significativement du reste du génome. La localisation des PAIs est également particulière, puisqu'ils se trouvent très souvent adjacents aux gènes d'ARNt et ils sont bordés par des éléments génétiques mobiles (11). Les PAIs sont en général des structures hétérogènes reflétant de nombreux événements d'acquisition d'ADN étranger ou réarrangements (12).

De nombreux logiciels et algorithmes sont maintenant utilisés afin d'identifier les PAIs que l'on retrouve chez plusieurs pathogènes tels que *Campylobacter.*, *Salmonella* et *Shigella* (13). Nous parlerons de façon plus détaillée de ce phénomène dans le prochain chapitre.

I.1.4 Diagnostic dans les matières fécales

I.1.4.1 La coproculture

Le diagnostic biologique par la coproculture se fait en fonction de différents contextes : La coproculture standard qui comprend la recherche de *Salmonella* spp., de *Shigella* spp. et de *Campylobacter* spp. (voire *Yersinia enterocolitica* si le sujet est diarrhéique) est appliquée à l'adulte et à l'enfant de plus de deux ans (14).

Chez l'enfant de moins de deux ans, en plus de la coproculture standard, il est effectué la recherche supplémentaire des *E. coli* entéropathogènes. Dans le cas particulier du nouveau-né, la recherche dans le méconium de bactéries responsables d'infections néonatales telles que *Listeria monocytogenes*, *E. coli* K1 et *Streptococcus agalactiae* (groupe B) est recommandée (14).

La réalisation d'une coproculture dans un contexte épidémioclinique particulier comme les situations d'épidémie de choléra, de TIAC, de recherche de germes particuliers (détection de BMR) chez certains sujets spécifiques (patients VIH+, patients ayant un SHU), de recherche de portage chez les cuisiniers, chez les patients sous traitement antibiotique fait appel à l'utilisation de milieux appropriés à chaque cas en fonction des germes spécifiques recherchés (14).

La démarche diagnostique quel que soit le contexte comprend les étapes d'examen macroscopique des selles qui peut orienter sur la physiopathologie d'une diarrhée ; d'examen microscopique direct des selles à l'état frais qui permet d'évaluer la présence de leucocytes et d'hématies, la densité et la mobilité de la flore bactérienne, la présence de parasites, d'éléments fongiques ; d'examen si nécessaire du frottis coloré au Gram permettant d'apprécier l'importance et l'équilibre de la flore.

La mise en culture proprement dite consiste à ensemencer différents milieux en fonction des germes à rechercher, et donc du contexte dans lequel se fait l'examen. L'isolement sera suivi de l'identification et éventuellement d'un typage sérologique (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*) et d'un antibiogramme. La figure 1 résume la démarche diagnostique générale d'une coproculture classique.

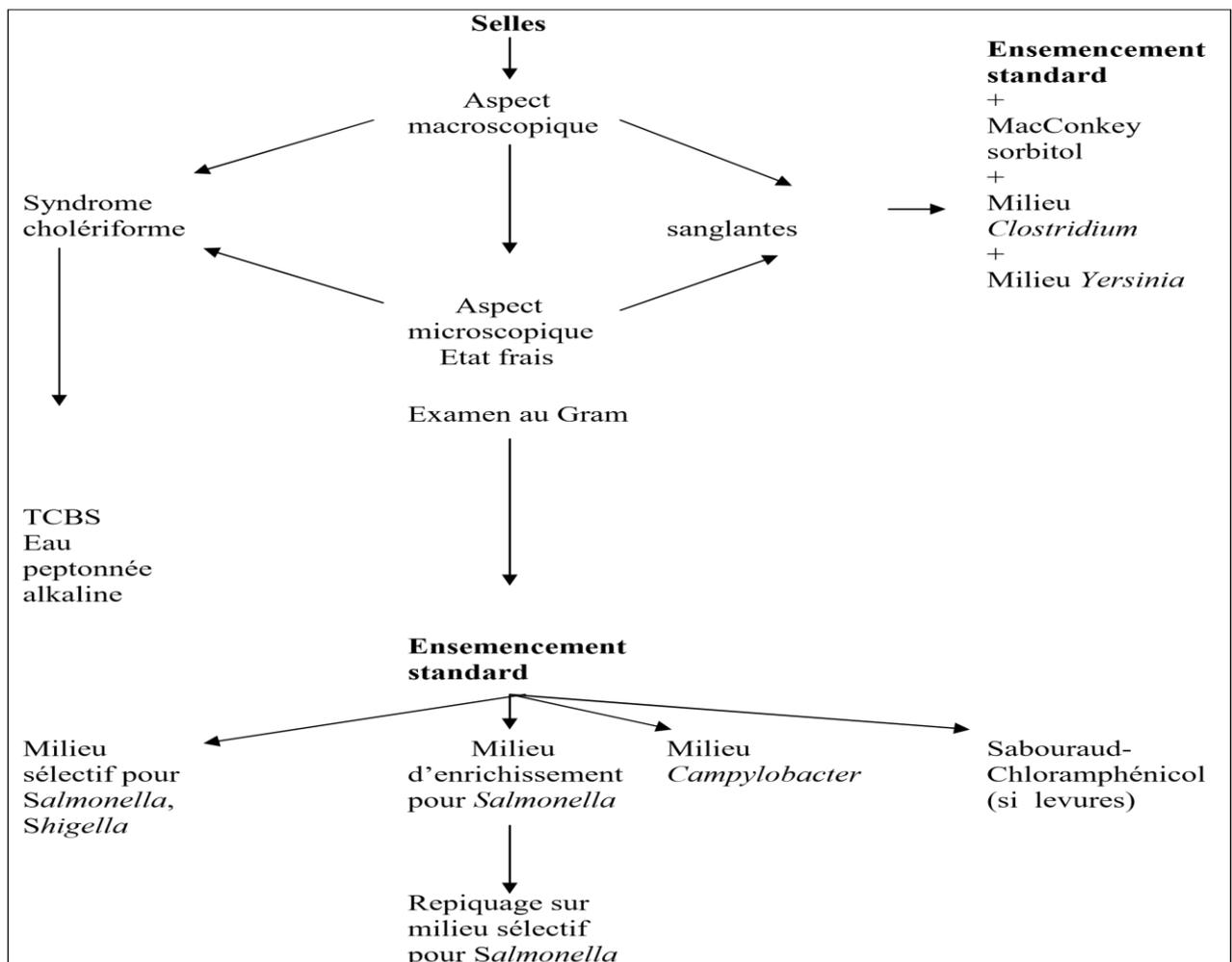


Figure 1 : Démarche diagnostique d'une coproculture classique (15).

I.1.4.2 Diagnostic moléculaire par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction), est une technique de réplication ciblée *in vitro*. Elle copie une séquence d'ADN spécifique par une série de réactions, et peut amplifier des séquences d'ADN cibles présentes en quantités infinitésimales au sein d'une population de molécules d'ADN.

Dans le cas spécifique de diagnostic des bactéries entéro-pathogènes (BEP), certains critères généraux doivent être pris en compte lors d'un travail sur les matières fécales : tout d'abord le stockage des prélèvements se fait en général à -20°C ou à -80°C si les extractions ne peuvent être réalisées peu de temps après la collecte d'échantillons (16). Aussi, le choix d'une méthode d'extraction doit tenir compte du fait que les matières fécales contiennent énormément d'inhibiteurs de PCR que l'extraction doit éliminer au maximum (17).

I.1.4.3 Autres méthodes de diagnostic

I.1.4.3.1 Le diagnostic antigénique

Les antigènes recherchés sont soit des constituants de l'agent pathogène : flagelles, pili, capsules, protéines de surface ; soit des antigènes solubles ou diffusibles retrouvés au siège de l'infection ou à distance ; soit des toxines bactériennes.

Plusieurs techniques permettant de rechercher des antigènes bactériens spécifiques directement sur les selles sont actuellement commercialisées. Parmi elles, l'immunocapture ou immunochromatographie sur membrane est devenue une technique de routine rapide pour le diagnostic de certains germes : toxines de *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, toxine de *V. cholerae* (15).

I.1.4.3.2 La Culture cellulaire

Certaines bactéries entéro-pathogènes (BEP) peuvent être diagnostiquées par culture cellulaire : cellules HeLa pour rechercher *E. coli* entéro-invasif ; cellules véro pour rechercher *E. coli* entéro-hémorragique (15).

I.2 CHAPITRE II : ETUDE MONOGRAPHIQUE

Escherichia coli

E. coli est le membre le plus courant et le plus important du Genre *Escherichia*. Cet organisme est associé à une variété de maladies, comme des gastro-entérites et des infections extra-intestinales telles que les UTI, la méningite et la septicémie. Plusieurs de ses souches sont capables de provoquer des maladies, avec certains sérotypes associés à une plus grande virulence (par exemple, *E. coli* O157 est la cause la plus fréquente de colite hémorragique et de Syndrome hémolytique urémique).

I.2.1 Caractères généraux

I.2.1.1 Caractères morphologiques et culturaux

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 extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche (Figure 2). Ce germe non exigeant, sur gélose ordinaire donne des colonies lisses, brillantes et homogènes (18).

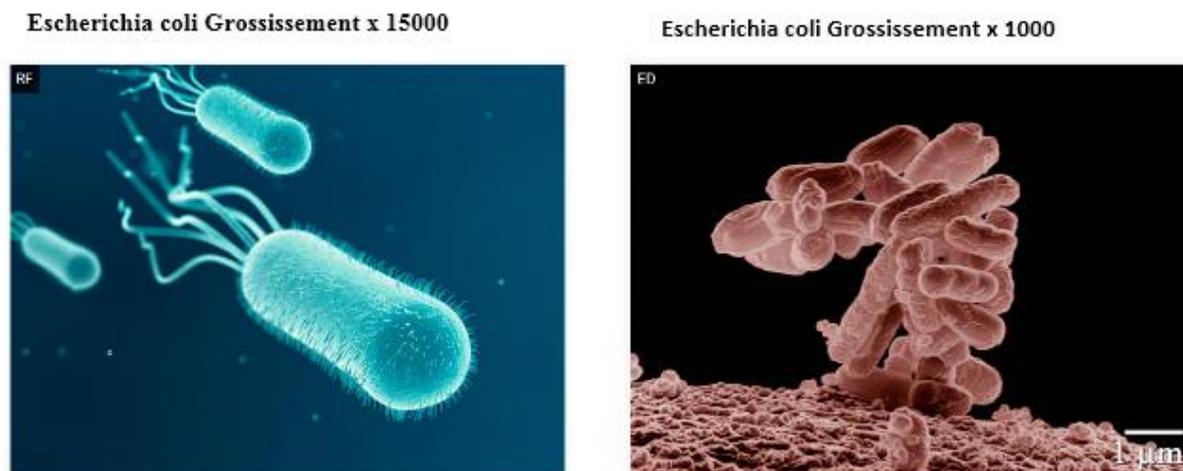


Figure 2: *Escherichia coli* sous microscope électronique (19)

Source : <http://www.gettyimages.com/photos/e.-coli>

I.2.1.2 Caractères biochimiques

Escherichia coli possède une catalase mais est dépourvue 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 dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille (18). Les caractères biochimiques sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Caractères biochimiques d'*Escherichia coli* (18).

Test	GLU	LAC	H ₂ S	GAZ	CS	GEL	MAL	LDC	NIT	ODC	ADH	URE	TDA	VP	ESC
Résultats	+	+	+	+	-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-

+ : Caractère positif ; - : Caractère négatif ; +/- : Caractère inconstant

I.2.1.3 Caractères antigéniques

I.2.1.3.1 Antigènes somatique O

Les antigènes somatiques sont composés de plus de 150 lipopolysaccharides complexes. Actuellement certains laboratoires d'analyses médicales utilisent l'agglutination avec des sérums pour déterminer le sérotype, mais cette technique est limitée par le nombre de plus en plus élevé de sérums à fabriquer, par la présence d'agglutination croisée entre les antigènes O de *Escherichia coli*, *Shigella* et ceux de *Salmonella* (20).

I.2.1.3.2 Antigènes de surface ou d'enveloppe K

Il existe 3 types d'antigène K désignés par les lettres L, A ou B.

- **L'antigène L** : est le plus fréquent mais est thermolabile (il est détruit en une demi-heure à 100°C), donc le chauffage provoque une perte du pouvoir antigénique, du pouvoir de fixer les anticorps et du pouvoir de masquer l'antigène O (18).
- **L'antigène A** : est rare, c'est un antigène capsulaire (les *Escherichia coli* encapsulés sont relativement fréquents dans les infections urinaires). L'Ag A est très thermostable (il faut un autoclavage pour le détruire) (18).
- **L'antigène B** : est toujours présent chez les *Escherichia coli* entéro-pathogènes responsables de gastro-entérite infantile. Il a une thermolabilité intermédiaire : après une demi-heure à 100°C, la fixation de l'anticorps est toujours possible mais le pouvoir antigénique se perd progressivement (en fonction de la durée de chauffage) (18).

La figure 3 qui suit trace le cycle de vie d'*Escherichia coli*.

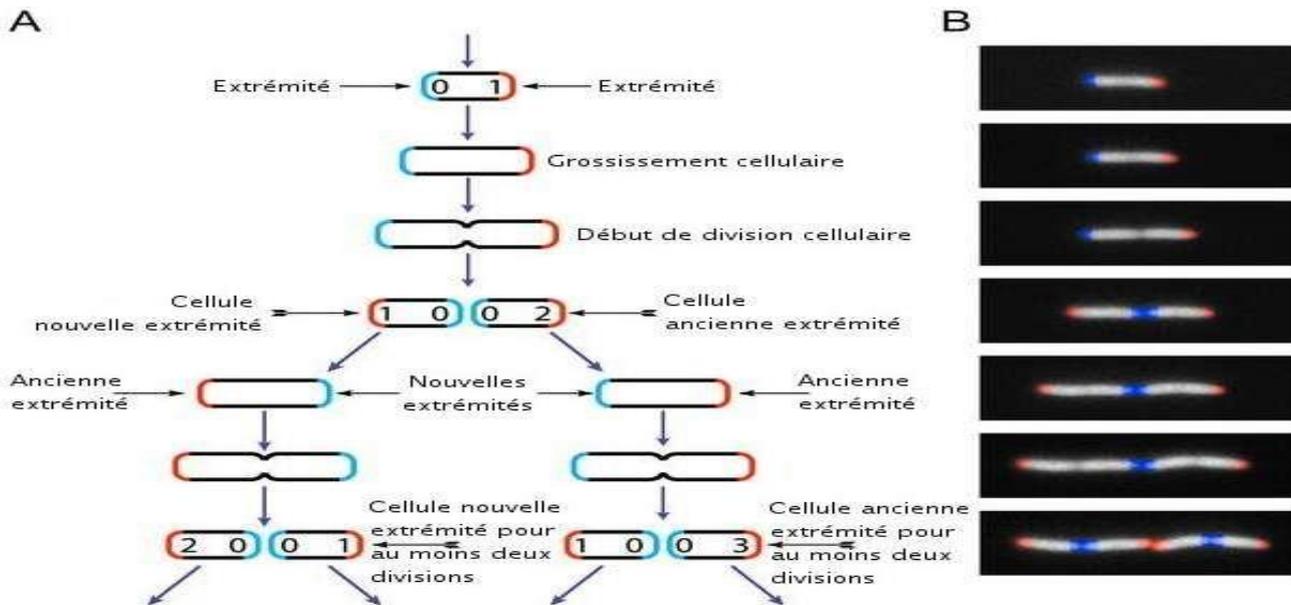


Figure 3 : Cycle de vie d'*Escherichia coli* (21)

I.2.2 Mode de transmission

I.2.2.1 Transmission alimentaire

- Les produits carnés sont à l'origine d'un grand nombre d'infection à *Escherichia coli*. (22). La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante (23). La viande d'autres animaux de boucherie, ou de volailles a également été mise en cause (24).
- Le lait et les produits laitiers non pasteurisés ont également été à l'origine d'épidémie. La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. En effet, les conditions de traite et l'environnement dans lequel elle se réalise jouent un rôle prépondérant dans la contamination du lait (25).
- Les fruits et légumes crus (salade, radis, épinards, oignons...) peuvent être directement contaminés par l'eau d'irrigation, à partir du sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages ou via l'activité de la faune du sol (23).

I.2.2.2 Transmission par le contact direct avec les animaux de ferme et leur environnement

La transmission d'*Escherichia coli* se fait par un contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, décrite lors de cas sporadiques (26). Par ailleurs, le taux de porteurs sains en *Escherichia coli* est plus élevé dans la population vivant en contact permanent avec les animaux (27). Par exemple, chez les éleveurs anglais, la séroprévalence à *Escherichia coli* varie de 1,6% à 5%. Le sol contaminé par les déjections des animaux de ferme a également été à l'origine d'épidémies à *Escherichia coli*, notamment durant des

événements en plein air, tels que des festivals ou des campements touristiques sur des sols préalablement pâturés par des ruminants (28). En Ecosse, du sol souillé a été impliqué dans 11% des infections environnementales à *E. coli* (28).

I.2.2.3 Transmission interhumaine

La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades. De plus, cette transmission est d'autant plus importante lorsque l'hygiène générale est mauvaise et que les contacts sont étroits. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches (29), les centres de soins journaliers et dans les centres psychiatriques. Ce mode de transmission est aussi responsable de l'extension de l'infection au sein des familles et dans les hôpitaux, la durée du portage serait en moyenne de 13 jours lors d'*Escherichia coli* entérohémorragique et de 31 jours lors de SHU (30).

I.2.2.4 Transmission hydrique

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades. Entre 1997 et 2004, le système de surveillance des Etats-Unis rapportait que 6% des épidémies d'origine hydrique étaient liées aux EHEC (31).

- La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés d'infection et d'épidémies à *Escherichia coli* (32).
- L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades dans un lac, ou dans une autre étendue d'eau naturelle (32).

La figure 4 dessine le schéma des différentes voies de contamination par *Escherichia coli*.

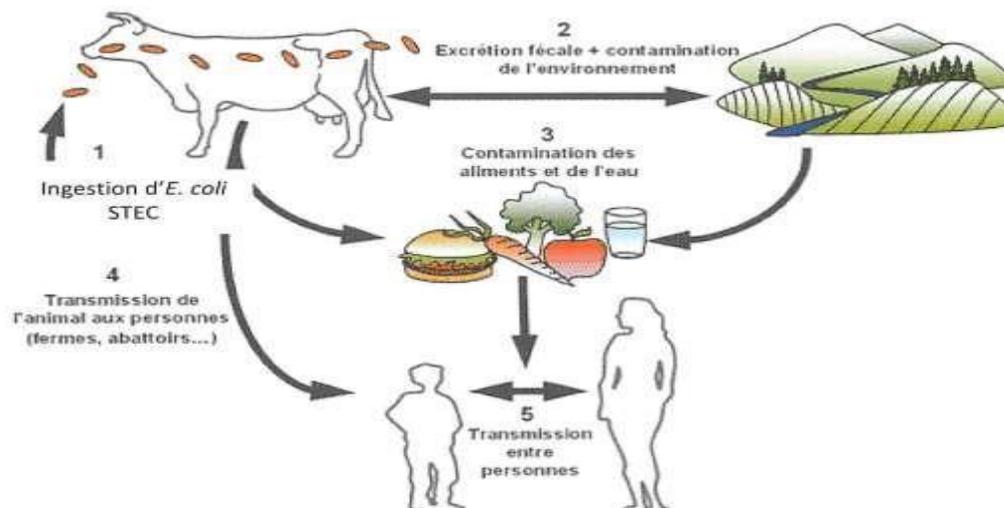


Figure 4: Les voies de contamination par l'*Escherichia coli* (18)

I.2.3 Génétique et pathogénécité

E. coli possède une large gamme de facteurs de virulence (Tableau III). En plus des facteurs généraux que possèdent tous les autres membres de la famille des Enterobacteriaceae, les souches d'Escherichia possèdent des facteurs de virulence spécialisés qui peuvent être placé dans deux catégories générales : les adhésines et les exotoxines.

La fonction de ces facteurs sera discutée avec plus de détails dans les sections suivantes.

Tableau III : Facteurs de virulence spécialisés associés à *Escherichia coli*

Bactéries	Adhésines	Exotoxines
ETEC	Antigènes du facteur de colonisation (CFA/I, CFA/II, CFA/III)	Toxine thermolabile (LT-1); toxine thermostable (STa)
EPEC	BFP; intimine	
EAEC	Aggregative adherence fimbriae (AAF/I, AAF/II, AAF/III)	Toxine Enteroaggregative thermostable; toxine codée par un plasmide
STEC	BFP; intimin	Shiga toxines (Stx1, Stx2)
EIEC	Invasive plasmid antigen	Hemolysine (HlyA)
Uropathogens	P pili; Dr fimbriae	

BFP, Bundle-forming pili; EAEC, enteroaggregative *E. coli*; EIEC, enteroinvasive *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; STEC, Shiga toxin-producing *E. coli*.

I.2.3.1 Génome d'Escherichia coli

Le patrimoine génétique de la souche *Escherichia coli* de laboratoire non pathogène a été entièrement séquencé en 1997. Leur génome comprend 4,6 millions de paires de bases codant environ 4 200 protéines. En 2001, le génome d'une souche d'*E. coli* entérohémorragique a été séquencé. Il comprend 5,5 millions de paires de bases codant 5 400 protéines. L'année suivante, le génome d'une souche d'*Escherichia coli* provoquant des infections urinaires et des méningites néonatales, a été séquencé. Il comprend 5,2 millions de paires de bases codant 5 300 protéines. La comparaison des génomes de ces trois souches d'*Escherichia coli* révèle que seulement 40 % de leurs gènes sont communs à titre de comparaison, 99 % des gènes de l'homme et des grands singes sont communs. Ceci témoigne du remarquable potentiel évolutif et de la versatilité de ce taxon bactérien. En effet, les souches d'*Escherichia coli* pathogènes ont acquis au cours de l'évolution un répertoire de gènes de virulence, qui leur permettent de coloniser de nouvelles niches écologiques en contournant les mécanismes de

défense de l'hôte. L'expression d'un répertoire spécifique de facteurs de virulence est corrélée à une pathologie particulière et permet de définir différents phatovars (33).

I.2.3.2 La plasticité génomique d'*Escherichia coli*

Depuis près de 10 ans, 250 génomes bactériens, pour la plupart d'intérêt médical, ont été déchiffrés et plusieurs centaines d'autres sont en cours de séquençage et d'annotation. La comparaison *in silico* des *E. coli* commensaux et pathogènes a révélé que les gènes chromosomiques sont ordonnés de manière relativement conservée d'une souche à l'autre. L'autre fait marquant de cette analyse génomique comparative est la présence chez les pathovars, de matériels génétiques supplémentaires (10 à 30%) (33). La plasticité du génome d'*Escherichia coli* est à la base de ce processus. La séquence complète du génome de plusieurs souches d'*E. coli* montre la présence de nombreuses séquences d'insertion (IS), de séquences bactériophagiques, ainsi que d'autres plages de séquences inusuelles qui témoignent de l'extraordinaire plasticité du génome de ce genre bactérien. Ce sont les isolats cliniques d'*E. coli* qui possèdent les plus grands génomes, alors que celui de l'*E. coli* de laboratoire, non pathogène, fait 4,63 Mb. Il apparaît ainsi que le fossé qui sépare les *Escherichia coli* commensales des *Escherichia coli* pathogènes est dû à l'acquisition de gènes de virulence (18).

Il se pourrait que l'acquisition de ces gènes soit facilitée par une importante aptitude à muter. En effet, plus d'1% des isolats d'*Escherichia coli* ou de *Salmonella* impliqués dans des infections alimentaires sont des « mutateurs » qui présentent une forte tendance à muter, un phénomène corrélé à une déficience dans certains systèmes de réparation de l'ADN. Les gènes de virulence sont le plus souvent localisés sur des éléments génétiques transmissibles comme des transposons, des plasmides ou des bactériophages. De plus, ils peuvent être regroupés sur de grands blocs d'ADN chromosomique appelés « îlots de virulence » (18).

I.2.3.3 Comparaison entre le génome des souches pathogènes et celui des souches commensales

La comparaison du génome des souches pathogènes et du génome des souches commensales montre qu'il y a une différence de taille et d'organisation. Ainsi, l'évolution des différents pathovars s'est faite au gré de l'acquisition de séquences nouvelles, insérées sur le chromosome ou sur des plasmides. Ces séquences se retrouvent en majeure partie sur des PAI, conférant la virulence des pathovars. Cependant, l'insertion de groupes de gènes plus petits a également été démontrée. Ces groupes de gènes confèrent des avantages aux bactéries pathogènes, et permettent leur survie (34).

I.2.3.4 La diversité génétique et les éléments génétiques mobiles

I.2.3.4.1 La diversité génétique

La variabilité génétique qu'on retrouve chez les *Escherichia coli* est due à la grande plasticité qui caractérise leur génome (35). Les comparaisons des séquences des génomes disponibles

et des différents facteurs de virulence acquis avec l'évolution de l'espèce ont mis en évidence l'existence de deux fonds génétiques principaux :

- Le fond commun (« core genome ») : présent dans toutes les souches d'*Escherichia coli*.
- Le fond dérivé : très différent entre les souches, qui permet l'expression des facteurs de virulence provoquant des maladies plus sévères. Par exemple, les souches associées à une diarrhée sévère et aigue, indiquant un point important dans l'évolution de l'espèce (36).

Le nombre total des gènes de l'espèce était estimé à 17.838 gènes en 2009. La majorité des souches, porte environ 4.721 gènes, et seulement 1.976 gènes appartiennent au fond commun c'est à dire que uniquement 11% des gènes connus sont communs à toutes les souches d'*Escherichia coli* (37). Avec les séquences génomiques connues à ce jour, on sait que les gènes communs à toutes les souches n'augmentent pas plus que ceux déjà connus, par contre le nombre propre aux sous-groupes ne cesse d'augmenter (38).

Cette diversité est due aux éléments génétiques mobiles qui portent les facteurs d'adaptabilité et de virulence (22).

1.2.3.4.2 Les éléments mobiles de pathogénicité

Les éléments génétiques ainsi échangés peuvent se regrouper en 4 catégories (Figure 5) : les plasmides, les transposons, les phages et les îlots de pathogénicité (39).

- **Les plasmides**

Les plasmides sont définis comme étant des structures d'ADN double brin, circulaire et autonome du chromosome bactérien par rapport à leur contrôle et leur réplication. Leur taille varie de quelques kilo bases à quelques centaines de kilo bases. Ils peuvent être transférés horizontalement par conjugaison ou mobilisation, entre bactéries de même espèce ou non. Ce sont les éléments du génome les plus mobiles (39).

- **Les transposons**

Les transposons sont des séquences d'ADN qui peuvent être transférées avec ou sans répliquions depuis un chromosome vers un ou plusieurs plasmides. Ils ne sont pas autonomes (40).

- **Les phages**

Les phages, incorporés au chromosome ou au plasmide, apportent de l'information génétique supplémentaire à leur bactérie de l'hôte (40).

- **Les îlots génomiques et/ou de pathogénicité**

Les îlots génomiques et/ou de pathogénicité regroupent des gènes qui confèrent à leurs bactéries hôtes des caractères de versatilité et d'adaptabilité ainsi que de virulence. Ces îlots se caractérisent par un contenu G+C qui diffère du reste du génome, par des motifs de

séquences répétées qui flanquent leurs extrémités, et par une insertion chromosomique au niveau des gènes d'ARN de transfert. Ces caractéristiques témoignent de leur acquisition par un processus transhorizontal.

Ils comprennent environ entre 10 et 200 kb, ce qui représente de vastes parties du génome(12). Ils ont été initialement identifiés chez les *Escherichia coli* uro-pathogènes (33). Les îlots confèrent donc à la bactérie hôte des fonctions ou de la capacité supplémentaire d'adaptation au milieu, de résistance aux antibiotiques, capacités métabolique (la capture du fer), capacité de symbiose ou de virulence par exemple la plupart des gènes codant pour la production de facteurs de virulence chez *Escherichia coli* trouvent dans des îlots de pathogénicité (12).

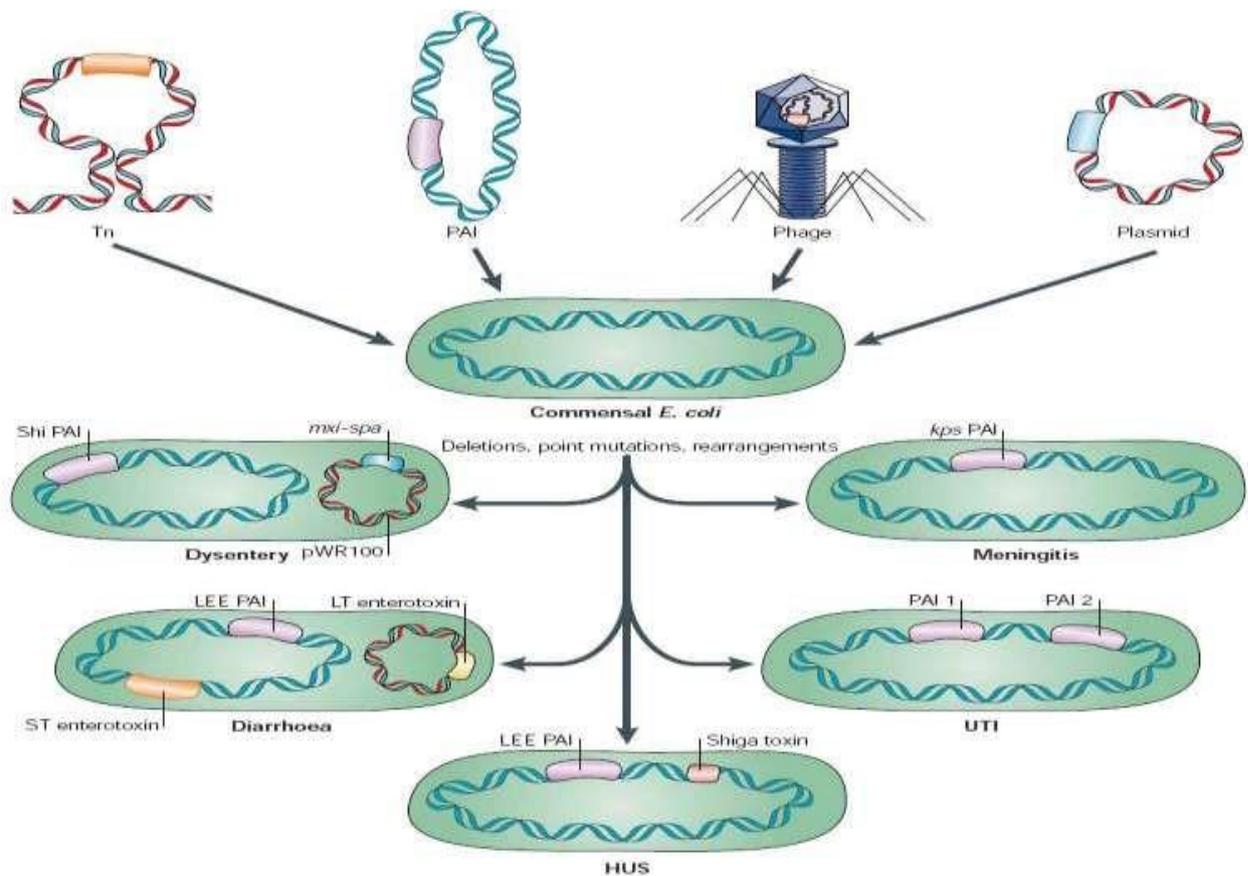


Figure 5 : Les éléments génétiques mobiles (22).

I.2.3.5 Pouvoir pathogène

I.2.3.5.1 Les facteurs de virulence

La définition des facteurs de virulence et la compréhension des mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène des souches d'*Escherichia coli* sont des préalables indispensables à l'évaluation du risque pour la santé publique lié à l'existence de ces pathogènes.

Ainsi, la combinaison des facteurs de virulence impliqués dans le pouvoir pathogène des souches restent encore à déterminer (36). L'étude des facteurs de pathogénicité d'*Escherichia coli* a montré que dans l'espèce, il existe de nombreuses variantes des facteurs : (36).

I.2.3.5.1.1 Les facteurs de virulence potentiels

- **Une capsule** qui s'oppose à la phagocytose.
- Des protéines de la membrane externe et le LPS donnant aux bactéries la capacité d'échapper à l'activité bactéricide du sérum de l'hôte en s'opposant à la fixation du complément.
- Des systèmes de captation du fer : Les sidérophores : notamment codé par l'îlot de pathogénicité fournissant aux bactéries le fer indispensable à leur multiplication, au détriment de la transferrine.
- Des toxines
 - L'endotoxine commune aux entérobactéries
 - Les entérotoxines ST (thermostables) et LT (thermolabiles). Ce sont des toxines cytotoxiques qui agissent sur le contrôle entérocytaire de la sécrétion hydro-électrolytique la toxine LT est proche de la toxine cholérique.
 - Les cytotoxines SLT1 et SLT2 (Shiga-like toxine). Ce sont des toxines qui altèrent l'intégrité des entérocytes. On les appelle encore des vero-toxine (VT) à cause de leur effet toxique sur les cellules vero en culture.
 - (Vervet origine - vervet, un singe africain). Sat et Vat : Sat (secreted autotransporter toxin) et Vat (vacuolating autotransporter toxin) sont des toxines de type V, de la famille des auto-transporteurs. Elles vont produire une vacuolisation et un engorgement cellulaire.

Vat toxine entré dans la pathogénèse d'une infection extra-intestinale d'*E. coli* n'a pas encore été bien identifié.

Sat toxine provoque un dommage sévère dans les reins, perte de la membrane glomérulaire, perte de l'épithélium des tubules, et une vacuolisation du tissu, mais sans avoir un rôle déterminé dans la colonisation de la bactérie

- Des protéases, telles que la sérine protéase, la catalase peroxydase, la métallo-protéase.
- Des systèmes de résistance à l'acidité gastrique et des uréases (41).

La liste de ces facteurs de virulence potentiels ne cesse de s'allonger mais, à ce jour, leur rôle respectif dans la pathogénie d'*Escherichia coli* n'est pas démontré.

- Les facteurs de virulence peuvent être codés par des gènes trouvés dans des transposons (Tn), des îlots de pathogénicité (PAI), des bactériophages (Phage) et/ou dans des plasmides. Selon les pathovars, on trouvera les différents éléments acquis par le transfert horizontal d'information génétique. De cette façon, les souches provoquent plusieurs maladies et symptômes comme une dysenterie, une méningite chez les nouveau née, une diarrhée, une infection urinaire (UTI), ou (SHU), portent

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

des éléments génétiques différents, qui leur confèrent des facteurs de virulence spécifiques et donc des avantages de colonisation et survie dans un environnement spécifique (22).

I.2.3.5.1.2 Shiga toxine (Stx) d'Escherichia coli:

I.2.3.5.1.2.1 La production du Shiga toxine

Bien que la production de toxines (Stxs) soit nécessaire, elle n'est pas suffisante pour qu'une souche STEC puisse induire la maladie chez l'homme. En effet, les souches d'*Escherichia coli* associées à la maladie chez l'homme sont capables d'adhérer aux entérocytes en provoquant le plus souvent la formation de lésions d'attachement et d'effacement (A/E).

Certaines souches d'*Escherichia coli* produisent une cytotoxine qui est létale pour les cellules.

Cette toxine proche de la toxine Shiga de *q* a été désignée Shiga like toxine (Slt) et Shigatoxine (Stx) Il ya plusieurs études qui ont permis de distinguer deux types antigéniques de toxines. Les deux types de toxines ont été initialement dénommés Slt-I et SltII et ultérieurement Stx1 et Stx2 (42).

I.2.3.5.1.2.2 Génétique et structure des Shiga toxines

Ces toxines sont des holoprotéines de 70 k Da constituées d'une sous-unité A possédant l'activité enzymatique et de 5 sous-unités B pour binding ou liaison au récepteur.

La sous-unité A est codée par le gène stxA et la sous-unité B codée par le gène stx B. Ces deux gènes forment un opéron porté par des phages lysogènes spécifiques de type lambda à l'exception de la production de la toxine Stx 2, l'opéron stx1 code pour la toxine Stx1 et l'opéron stx2 code pour la toxine Stx2 (42).

I.2.3.5.1.2.3 Mécanismes d'action des Shigatoxines

Au niveau de la cellule eucaryote, les sous-unités B de la toxine Stx, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide (Gb3) (galactose- α (1-4), galactose-(1-4) glucosyl-céramide) (39). Une fois la toxine internalisée par un mécanisme classique d'endocytose, elle subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous-unité A est alors scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont disulfure. La partie A1 ainsi activée est transloquée dans le cytoplasme où elle exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S bloquant la sous unité 60S du ribosome et l'arrêt de la synthèse protéique et la mort cellulaire (Effet apoptotique). La toxine de la sous-unité B, en particulier induirait la production de cytokines par les cellules intestinales. Elles activent la réponse inflammatoire et le développement des lésions au niveau de la barrière intestinale favorisant la dissémination systémique des toxines au niveau de l'organisme. Les différents aspects de la pathologie liée à la production des toxines Stx par les STEC peuvent être reproduits chez de nombreuses espèces animales. Les différentes études ont confirmé le rôle des toxines Stx dans la pathologie des STEC (39).

I.2.3.5.1.3 Les facteurs d'adhésion

Les adhésines confèrent aux souches d'*Escherichia coli* la propriété de se fixer aux cellules épithéliales, de nature protéique, elles sont portées le plus souvent par des pili communs. L'adhérence constitue une étape essentielle de la pathogénèse due aux bactéries entériques. Les principaux sont les facteurs impliqués dans le développement des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) des entérocytes, qui est responsable de diarrhées, et se caractérisent par un effacement des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal dans la zone de contact entre la bactérie et la cellule cible (39).

Les adhésines confèrent à la bactérie la capacité de s'attacher aux récepteurs spécifiques de l'hôte. Par exemple, pour la production de fimbriae qui utilise les récepteurs galactose- α -1-4-galactose des cellules uro-épithéliales. Les gènes (pa ou prs) qui codent pour cette adhésine sont souvent liés génétiquement aux clusters hly et cnf, codant pour la toxine CNF.

Une autre adhésine, le fimbriae S, codée par les gènes sfa, est utilisée pour s'attacher aux récepteurs de l'acide sialique. Les fimbriae de type 1 (fim), et pap (pyelonephritis-associated pilus) ou fimbriae P, sont les adhésines les mieux caractérisées ; elles confèrent aux bactéries la capacité de s'attacher aux cellules de l'hôte, une étape clé dans la pathogénèse de l'infection. Leur expression est régulée par des stimulations de 80 types antigéniques de capsule (antigènes « K »). Les capsules sont constituées de couches de polysaccharides assemblés à la surface de la bactérie (39).

I.2.3.5.1.4 L'entérohémolysine d'Escherichia coli

L'hémolysine nommée E-HlyA est une protéine codée par le gène ehxA sur l'opéron plasmidique ehxCABD. E-HlyA appartient aux groupes des toxines RTX (Repeats in Toxin) ; son mécanisme consiste à s'insérer dans la membrane plasmique, formant des pores, ce qui aboutit à la lyse osmotique de la cellule cible consécutive à la fuite du contenu cellulaire plasmatique, en provoquant la lyse des hématies, les hémolysines provoquent la libération de fer dans le milieu ce qui est propice au développement des bactéries (43).

Plusieurs types d'hémolysines (α , β , etc...) (44) sont produits par des souches d'*Escherichia coli* pathogènes (ExPEC, EIEC, ETEC...) et sont actifs sur différents types cellulaires tels que les lymphocytes, les granulocytes, les érythrocytes et les cellules épithéliales rénales. Certaines, actives seulement sur des érythrocytes lavés, ont été retrouvées chez des souches EHEC et sont dénommées entérohémolysines (Ehly) (22).

I.2.3.5.2 Le support génétique de la virulence

La diversité des souches incriminées pourrait s'expliquer en partie par la nature des supports génétiques des gènes de virulence. Les souches d'*Escherichia coli* possèdent jusqu'à 20 % d'information génétique supplémentaire acquise, vraie au cours de transferts horizontaux d'ADN. L'origine étrangère de ces fragments d'ADN c'est un pourcentage en G+C et à une utilisation préférentielle des codons différents. Les nouveaux gènes acquis sont localisés sur

le chromosome, mais beaucoup d'autres sont localisés sur des réplicons extra chromosomiques par exemple les plasmides. Au cours de l'évolution, ces gènes peuvent s'intégrer dans des structures relativement indépendantes, comme les transposons ou les phages, ou se regrouper pour former des îlots de pathogénicité (45).

I.2.3.5.3 Les gènes codant les facteurs de virulence

La virulence d'une bactérie est une mesure quantitative de son pouvoir pathogène. Les gènes de virulence codent pour des propriétés qui sont impliquées dans le processus de pathogénie. Les gènes qui codent pour les principaux facteurs de virulence sont portés par des éléments mobiles du génome (Figure 6), éléments acquis lors d'échanges génétiques par transfert horizontal : îlots de pathogénicité, bactériophages et plasmide (46).

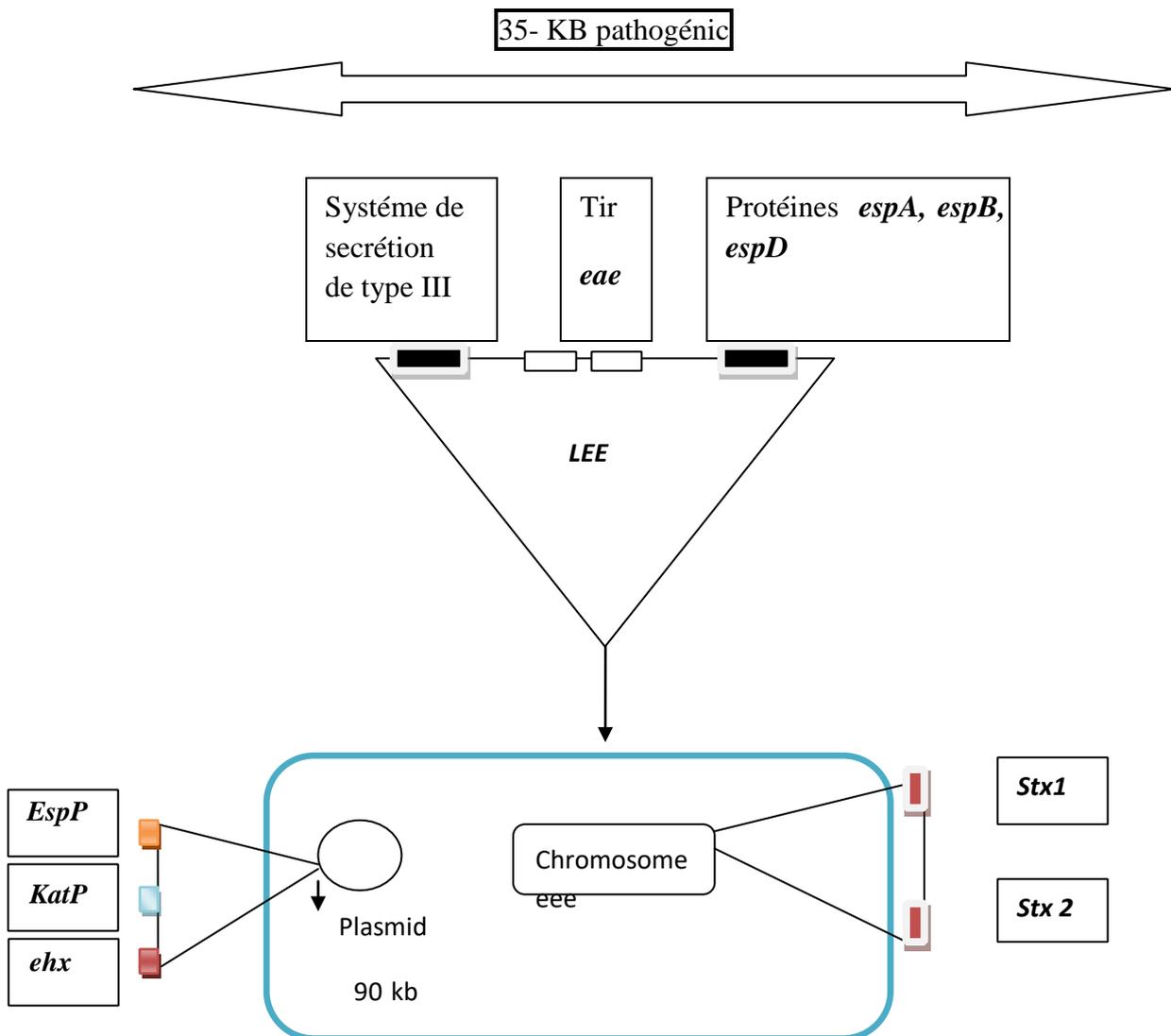


Figure 6: Les gènes codant les principaux facteurs de virulence connus portés par les éléments mobiles du génome (22).

- **Le LEE (locus of enterocyte effacement)**

Le LEE est un îlot de pathogénicité, défini comme un locus contenant de nombreux gènes impliqués dans la virulence des souches des bactéries. Il ya d'autres bactéries capables de former des lésions A/E qui sont également porteuses du gène LEE.

La formation de ces lésions d'attachement/effacement est sous l'influence des gènes chromosomiques au sein du LEE et plasmatiques sur le plasmide EAF (EPEC adherence factor) (22). L'insertion du LEE se fait à des endroits différents du génome de cette bactérie. De plus, d'autres facteurs de virulence, chromosomiques ou plasmidiques responsables de l'infection, ont été isolés :

EAST : toxine a poids moléculaire faible, isolée après un épisode de diarrhée à EAaggEC sur des enfants. Cette toxine a été retrouvée également chez des EHEC, des ETEC, des DAEC, des EPEC et des salmonelles (39). Elle est codée par le gène *aspA*, que l'on retrouve sur le plasmide ou sur le chromosome. Différentes variantes de cette toxine ont été trouvées dans des infections qui causent par exemple la diarrhée plus sévère chez l'homme (22).

I.2.3.6 Les types de plasmide des *Escherichia coli*

Bon nombre des facteurs de virulence sont codés sur des plasmides (Tableau IV). Aux adhésines et toxines citées précédemment, on peut rajouter les facteurs de virulence, codés sur le plasmide pINV, ainsi que d'autres gènes conférant des avantages sélectifs pour les souches porteuses (gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes codant pour des colistines, des gènes codant pour des sidérophores). Les grandes catégories des plasmides s'échangent ainsi au sein de la population des *Escherichia coli* (47).

Tableau IV : Les principaux types de plasmide rencontrés dans l'*Escherichia coli* (33).

Nom	Souches porteuses	Gènes de virulence portés
Pas de nom particulier	ETEC	Adhésines, gènes de résistance aux antibiotiques, toxines <i>LT</i> et <i>ST</i> .
EAF	EPEC	Gènes <i>bfp</i> et régulateur <i>per</i> .
AA	EaggEC	Entre autres <i>aafl</i> et <i>astA</i> .
pINV	EIEC	Système de sécrétion de protéines de type III (<i>mix</i> , <i>spa</i>), protéines sécrétées (<i>ipa</i>) et toxine <i>Sen</i>
ColV	ExPEC	Gènes de résistance aux antibiotiques ; gènes codant pour des colistines et sidérophores

I.2.4 Antibiorésistance

Un antibiotique est un composé chimique, naturellement produit par un micro-organisme ou, produit de synthèse dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose et d'une manière spécifique. Il a le pouvoir d'inhiber la croissance voire de détruire d'autres bactéries (45). Ainsi, l'antibiorésistance est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques. Cette résistance confère donc à celui-ci un avantage sélectif qui lui permet de se multiplier en présence de l'antibiotique.

I.2.4.1 Résistance intrinsèque et résistance acquise

La résistance intrinsèque aux antibiotiques est due aux propriétés intrinsèques physiologiques, biochimiques ou structurales de la bactérie qui sont indépendantes de tout contact avec un antibiotique. Il s'agit donc d'une résistance naturelle si toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. Elle est à transmission verticale.

La résistance acquise survient lorsqu'un individu d'une population de bactéries normalement sensibles devient résistant en raison d'une pression environnementale. Elle fait suite à des modifications génétiques acquises par mutation spontanée de gènes chromosomiques ou par transfert horizontal de matériel génétique qui permet une diffusion des gènes de résistance (48). L'exposition à des antibiotiques conduit à une multiplication sélective de bactéries résistantes qui peuvent persister et remplacer les bactéries sensibles (49).

I.2.4.2 Mécanismes et transfert de résistance

Il existe plusieurs mécanismes de résistance contre un large spectre d'antibiotiques ou spécifiques d'un seul antibiotique. Les mécanismes peuvent aboutir à une action réduite ou à une perte d'effet de l'antibiotique sur sa cible. Une grande variété de mécanismes d'action existe dont le développement d'une voie enzymatique alternative, la diminution de l'accumulation cellulaire des antibiotiques, la modification de la cible des antibiotiques, la réduction de la perméabilité membranaire et l'efflux des antibiotiques (50). Les mécanismes de transfert d'ADN entre espèces bactériennes permettent la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques. Le système de transfert vertical transmet l'acquisition de nouvelles résistances à la descendance suite aux divisions cellulaires. Tandis que le transfert horizontal des éléments génétiques contribue à la propagation des gènes de résistance par trois mécanismes principaux. Par conjugaison, un élément génétique mobilisable est transféré d'une bactérie à une autre. La bactérie émettrice porte un pilus au travers duquel l'ADN est injecté pour passer dans une autre bactérie de la même espèce ou d'espèces voisines.

Le processus de transduction permet à un segment d'ADN d'être transféré d'une bactérie à une autre via un bactériophage. En se répliquant, le phage intègre une partie du génome bactérien. En quittant la cellule, il emporte des gènes bactériens supplémentaires qui pourront être transférés dans une autre bactérie.

Enfin, la transformation est un processus au cours duquel la bactérie acquiert et incorpore de l'ADN exogène présent dans son environnement. L'ADN d'une bactérie, une fois capté, permet l'expression de ses gènes par la nouvelle bactérie (50).

En outre, le transfert horizontal de gènes est un processus par lequel des fragments d'ADN et des éléments génétiques mobiles peuvent être transférés entre les bactéries de même ou de différentes espèces. Ces éléments comprennent entre autres les éléments d'intégration et de conjugaison (ICE) incluant les transposons, les intégrons, les îlots génomiques, et d'autres éléments non classés intégrés dans les chromosomes (51).

La facilité de transfert du matériel génétique joue un rôle important dans la propagation de l'antibiorésistance d'une souche bactérienne à une autre. Les gènes de résistance ont par conséquent un fort potentiel de diffusion parmi les bactéries. Il en découle que les antimicrobiens peuvent être responsables de la multiplication des bactéries résistantes, aussi bien parmi les souches virulentes que dans la flore bactérienne normale (49).

I.2.4.3 Support génétique de l'antibiorésistance

Les gènes de résistance sont codés soit par les chromosomes, soit par des éléments génétiques tels que les plasmides, les transposons et les intégrons (49).

- **Chromosome**

La résistance chromosomique, événement rare, apparaît spontanément après une mutation dans le chromosome. L'antibiotique n'est pas l'agent mutagène mais il sélectionne les mutants devenus résistants. Cette résistance est confinée verticalement à l'espèce chez laquelle elle apparaît.

- **Plasmides**

Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomiques, capables de réplication autonome dans les bactéries. Vecteurs de mobilité pour les transposons et les intégrons, ils diffusent souvent des gènes qui confèrent aux bactéries certaines caractéristiques telles que la résistance, la virulence, la capacité de métaboliser des substances rares, et la persistance dans des conditions extrêmes (51). Ils portent également des gènes de transfert permettant le passage du plasmide d'une bactérie à une autre de la même espèce ou d'espèces différentes.

- **Transposons**

Un transposon est une séquence d'ADN capable de se déplacer et de se multiplier de manière autonome dans un génome. Il peut donc s'intégrer au chromosome de la bactérie et permet la dissémination des gènes de résistance (48).

- **Intégrons**

L'intégron est une structure portée par des plasmides, des transposons rarement sur le chromosome des bactéries. Les intégrons constituent un système de capture, d'expression et

de dissémination de gènes sous forme de cassettes. Ils sont impliqués dans la dissémination de la multirésistance des bactéries aux antibiotiques (48)(52).

– **Structure des intégrons**

Les intégrons sont des structures génétiques constituées de deux segments (région 5' conservée et région 3') encadrant une région centrale dans laquelle vont pouvoir être capturées des gènes de résistance insérés dans des cassettes.

– **Région 5' conservée**

La région conservée en 5' est commune à tous les intégrons. Elle est constituée par l'association de trois éléments. Premièrement, un gène *intI* code une intégrase qui est une recombinase spécifique de site. Cette enzyme catalyse l'insertion et l'excision de gènes contenus dans des cassettes de gènes (53). Puis, un site *attI* constitue le site spécifique de recombinaison, d'intégration préférentielle des cassettes. Enfin, un promoteur *Pc*, orienté dans le sens inverse du gène de l'intégrase, permet la transcription donc l'expression des gènes de cassettes. La cassette intégrée en premier, donc la plus éloignée du promoteur, est la plus faiblement exprimée.

– **Cassettes**

Dans la majorité des cas, la région conservée est suivie en 3' d'un réseau de cassettes orientées dans le sens inverse du gène *intI*. Les cassettes de gènes sont des unités fonctionnelles indépendantes, mobiles, non répliquatives, sous forme circulaire ou intégrée au site *attI*. Elles sont constituées d'une séquence codante et d'un site de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase. Des cadres ouverts de lecture (ORF : Open Reading Frame) ne codant pour aucune fonction connue sont associés à des sites *attC* sous forme de cassettes (48). Maintenues au cours de la division cellulaire, plusieurs cassettes peuvent exister en tandem sur un même intégron conférant ainsi une multirésistance à la bactérie qui l'héberge.

– **Région 3' variable**

Cette partie n'est pas toujours présente d'un intégron à un autre. Elle peut être constituée d'un gène conférant un phénotype de résistance aux antibiotiques comme le gène *sulI* responsable de la résistance aux sulfamides (54).

– **Principales classes d'intégrons de résistance**

Les intégrons impliqués dans la résistance aux antibiotiques sont regroupés en plusieurs classes en fonction de la nature de leur intégrase. Les intégrons de classe 1, 2 et 3 sont les mieux caractérisés et reconnus impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

Les intégrons de classe 1 sont très répandus. Ils ont été surtout décrits chez les entérobactéries et autres bactéries à Gram négatif chez des souches d'origine humaine, animale et environnementale(48). Chez ces intégrons, il existe un cadre de lecture ouvert ORF1 dont la présence permet d'augmenter l'efficacité de la première cassette (52).

Les intégrons de classe 2 ont une structure similaire à celle des intégrons de classe 1 et sont associés au transposon Tn7 (55). Ce transposon contient trois cassettes de résistance : *dfrAI* conférant la résistance au triméthoprim, *sat* à la streptothricine, *aadAI* à la streptomycine et à la spectinomycine. Des intégrons de classe 2 ont été aussi retrouvés chez des souches de bacille à Gram négatif d'origine humaine, animale ou environnementale (48).

L'intégron de classe 3, présentant 61% d'homologie avec *intII*, est constitué également dans sa région 5' d'un gène *intI* associé à un promoteur et recombinaison à un site *attI*. En outre, il possède un site de recombinaison *attI3* et deux régions promotrices (48).

I.2.4.4 Gènes de résistance aux antibiotiques

De nombreux gènes impliqués dans l'antibiorésistance ont été décrits (48)(56)(57). Toutefois, les gènes déterminant la résistance à quatre antibiotiques seront développés pour pouvoir expliquer les phénotypes d'antibiorésistance les plus retrouvés dans l'étude.

- **Quinolones (acide nalidixique)**

Les cibles d'action des quinolones sont les enzymes bactériennes ADN gyrase et topoisomérase IV. Les sous-unités de l'ADN gyrase sont codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*, celles de la topoisomérase IV par les gènes *parC* et *parE*. La résistance acquise aux quinolones implique surtout des mutations chromosomiques par substitution d'acides aminés dans une région des sous-unités des *gyrA* ou *parC* (56). La résistance aux quinolones peut également être médiée par des plasmides produisant une protéine codée par les *qnr* qui protège les cibles des quinolones. Le premier gène à médiation plasmidique impliqué dans la résistance aux quinolones (*qnrA*) a été rapporté en 1998. Des gènes de résistance aux quinolones à médiation plasmidique supplémentaires (*qnrB*, *qnrS*) et leurs homologues chromosomiques ont par la suite été découverts (58).

- **Tétracyclines**

Les mécanismes de résistance codés par des gènes résistants à la tétracycline comprennent entre autres l'inactivation enzymatique et la protection du ribosome. Plus de 35 classes de gènes résistants à la tétracycline ont été décrites. Les gènes de résistance à la tétracycline des classes A à D et G sont les plus fréquemment détectés chez les Entérobactéries. Le gène *tetA* a été trouvé sur les plasmides et les chromosomes, tandis que *tetB*, *tetC* et *tetD* ont été détectés sur les chromosomes de différents sérotypes de *Salmonella*. Le gène *tetG* a été identifié sur des îlots génomiques et d'autres types de phages (59).

- **Sulfaméthoxazole-Triméthoprim**

La résistance transférable à cette association d'antibiotiques est largement répandue. La résistance aux sulfamides est surtout médiée par deux enzymes codées par des gènes *sulI* ou *sulII*, trouvés à peu près à la même fréquence parmi les bactéries Gram-négatifs entéropathogènes résistantes aux sulfamides. Le gène *sulI* est aussi lié à d'autres gènes de résistance transférables (60).

La résistance au triméthoprime résulte généralement d'une mutation comme la modification de la perméabilité de la cible *dihydrofolatereductase*. La présence de gènes de résistance *dfr* codés par les plasmides est le mécanisme le plus commun, responsable de l'acquisition de la résistance au triméthoprime (57).

I.2.4.5 Virulence et antibiorésistance

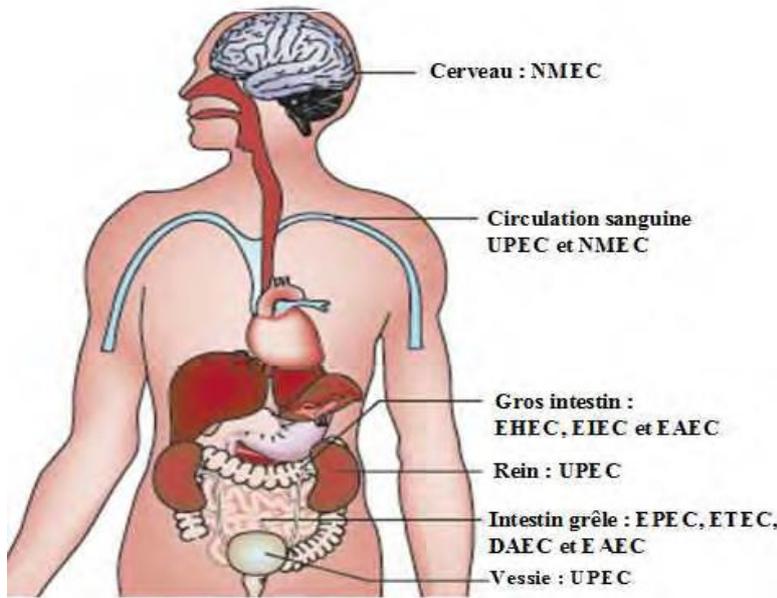
La virulence et l'antibiorésistance partagent des caractéristiques communes. Le développement de facteurs de virulence et l'évolution des déterminants de la résistance se chevauchent considérablement, et il est difficile de les considérer comme des processus indépendants. La recombinaison a un rôle important dans l'évolution des déterminants de la résistance aux antibiotiques. De même, la construction d'un îlot de pathogénicité nécessite le recrutement de différents gènes qui se recombinent pour produire un élément génétique unique contenant plusieurs gènes de virulence. De l'autre côté, les mutations et la sélection croisée sont parmi les mécanismes qui favorisent la sélection et la persistance des agents pathogènes les plus virulents et les plus résistants. Cependant, la résistance est associée dans la plupart des cas à une diminution de la virulence.

En outre, les déterminants génétiques des gènes de virulence et d'antibiorésistance pourraient être hébergés par le même élément transférable. D'une part, les plasmides sont d'importants vecteurs de diffusion de l'antibiorésistance et des déterminants de virulence. Cette association pourrait avoir un impact sur la propagation des clones de *Salmonella* plus résistants. En effet, le port des plasmides codant pour des facteurs de résistance et de virulence conduit à la sélection de déterminants de la résistance des bactéries dans des environnements non infectieux soumis à la pression sélective des antibiotiques. D'autre part, les ICE sont des éléments génétiques mobiles auto-transmissibles qui aident à la diffusion horizontale de gènes situés sur des plasmides ou des chromosomes. En théorie, ils peuvent capturer des gènes de virulence et les propager conjointement avec des gènes de résistance (51)(61).

I.2.5 Épidémiologie

Des souches d'*E. coli* sont normalement présentes en grand nombre dans le tractus GI. Bien que ces organismes puissent être des agents pathogènes opportunistes lorsque l'intestin se perforé et que les bactéries pénètrent dans la cavité péritonéale, la plupart des *E. coli* qui causent des IG et des maladies extra-intestinales le font parce qu'ils ont acquis des facteurs spécifiques de virulence encodés sur des plasmides ou dans un ADN de bactériophage. L'efficacité de *E. coli* en tant qu'agent pathologique est illustré par le fait que ces bactéries sont (62) les bacilles gram-négatives les plus courantes, isolé de patients atteints de septicémie (Figure 7), (63) responsable de plus de 80% de toutes les UTI communautaires acquises, de nombreuses infections hospitalières, et (64) éminente cause de gastro-entérite. La plupart des infections (à l'exception de la méningite néonatale et de la gastro-entérite) sont endogènes ; C'est-à-dire que les *E. coli* qui font partie de la flore microbienne normale du patient sont capables d'induire une infection quand les défenses de ce dernier sont compromises (traumatisme ou suppression immunitaire).

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako



(99).

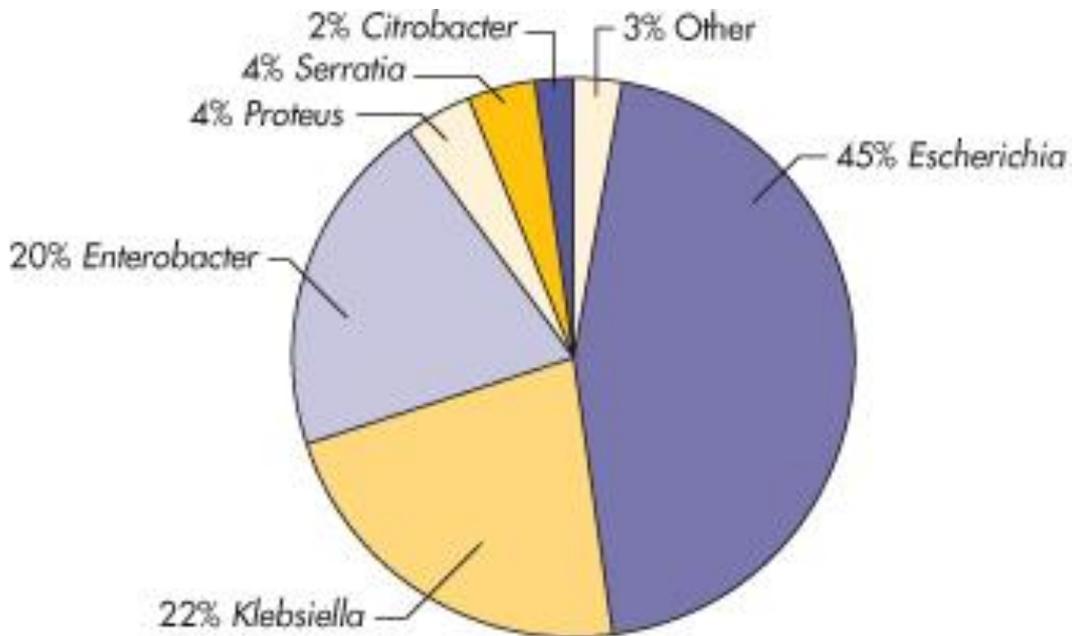
E. coli entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin et sont à l'origine de diarrhée, alors que *E. coli* entérohémorragique (EHEC) et *E. coli* entéroinvasive (EIEC) colonisent plutôt le côlon ; *E. coli* entéroaggrégative (EAEC) peut coloniser les deux.

E. coli uropathogène (UPEC) colonise le tractus urinaire jusqu'à la vessie et est à l'origine de cystites. En fonction des facteurs de virulence hébergés par les souches, les UPEC peuvent remonter jusqu'aux reins et entraîner une pyélonéphrite. De plus, les UPEC comme les *E. coli* à l'origine de méningites néonatales (NMEC) peuvent entraîner une septicémie (adapté de

Figure 7 : Sites de colonisation des *Escherichia coli* pathogènes (65).

I.2.6 Maladies cliniques

La figure 8 ci-dessus donne l'incidence des entérobactéries associées à une bactériémie.



© Elsevier. Murray: Medical Microbiology 5e - www.studentconsult.com

Figure 8 : Incidence des entérobactéries associées à une bactériémie. (Data courtesy Barnes-Jewish Hospital, St Louis, Mo.)

I.2.6.1 Gastro-entérite

Les souches d'*E. coli* qui causent la gastro-entérite sont subdivisées en plusieurs groupes. Ce chapitre portera l'accent sur Cinq de ces groupes : entérotoxigène, entérotoxigène, entéroagrégative, Shiga toxin-producing, et enteroinvasive *E. coli* (Tableau IV). Les trois premiers groupes provoquent principalement une diarrhée sécrétoire impliquant l'intestin grêle, et les deux derniers groupes concernent principalement le gros intestin.

Tableau V : Gastro-entérite causée par *Escherichia coli*

Organisme	Site d'action	Maladie	Pathogénèse	Diagnostic
<i>E. coli</i> Entérotoxigène (ETEC)	Intestin grêle	La diarrhée du voyageur; diarrhée infantile dans les pays en développement; diarrhée aqueuse, vomissements, crampes, nausées, fièvre de bas grade	Plasmide, entérotoxines thermostable (ST) et thermolabile (LT) qui stimulent une hypersécrétion de fluides et d'électrolytes	La plupart des épidémies américaines causées par des souches productrices de ST; immunodosages commerciaux disponibles pour la détection de ST dans des échantillons biologiques et des cultures; Tests de PCR utilisés avec des échantillons biologiques
<i>E. coli</i> Entérotoxigène (EPEC)	Intestin grêle	Diarrhée infantile dans les pays en développement; et vomissements aqueux, selles non sanglantes; considéré comme rare aux États-Unis	Histopathologie A / E médiée par des plasmides, avec perturbation de la structure des microvillosités normales entraînant une malabsorption et une diarrhée	Adhérence caractéristique aux cellules HEp-2 ou HeLa; des sondes et des tests d'amplification développés pour les cibles pili et gène formant un faisceau codées par un plasmide sur l'îlot de pathogénicité "locus of enterocyte effacement"
<i>E. coli</i> Enteroaggrégative (EAEC)	Intestin grêle	Diarrhée infantile dans les pays en développement et probablement développés; la diarrhée du voyageur; diarrhée aqueuse persistante accompagnée de vomissements, de déshydratation et de fièvre de bas grade	Adhérence agrégée par médiation plasmidique des bâtonnets («briques empilées») avec raccourcissement des microvillosités, infiltration mononucléaire et hémorragie; diminution de l'absorption du liquide	Adhérence caractéristique aux cellules HEp-2; Sonde d'ADN et tests d'amplification développés pour le plasmide conservé
<i>E. coli</i> producteur Shiga toxine (STEC)	Gros intestin	Diarrhée aqueuse initiale suivie d'une diarrhée grossièrement sanglante (colite hémorragique) de crampes abdominales; peu ou pas de fièvre; peut évoluer vers le syndrome hémolytique et urémique	STEC a évolué à partir de l'EPEC; Lésions A / E avec destruction des microvillosités intestinales, entraînant une diminution de l'absorption; pathologie médiée par les Shiga toxines cytotoxiques (Stx1, Stx2), qui perturbent la synthèse des protéines	Screen pour O157: H7 avec gélose au sorbitol MacConkey; confirmer par sérotypage; immunodosages (ELISA, latex agglutination) pour la détection des toxines Stx dans les échantillons de selles et les bactéries cultivées; Tests d'amplification de l'ADN développés pour les gènes Stx
<i>E. coli</i> Enteroinvasive (EIEC)	Gros intestine	Rare dans les pays en développement et développés; fièvre, crampes, diarrhée aqueuse; peut évoluer vers la dysenterie avec de rares selles sanglantes	Invasion médiée par des plasmides et destruction de cellules épithéliales tapissant le côlon	Sérénose (test de kératoconjonctivite de cobaye); essai de plaque dans des cellules HeLa; des sondes et des tests d'amplification pour les gènes régulant l'invasion (ne peut pas faire de distinction entre EIEC et Shigella)

A/E, Attachment/effacement; DNA, deoxyribonucleic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LT, labile toxin; PCR, polymerase chain reaction; ST, stable toxin.

I.2.6.1.1 E. coli entérotoxigène

E. coli entérotoxigène (ETEC) est l'une des plus communes causes de maladie diarrhéique bactérienne dans les pays en développement (Estimé à 840 millions de cas chaque année) et incriminé chez environ 30% des cas de diarrhées du voyageur dans ces pays. Parce que l'inoculum pour la maladie est élevé, les infections sont principalement acquises par la consommation de substances contaminées par voie fécale de la nourriture ou de l'eau. La propagation de personne à personne ne peut se produire. La diarrhée sécrétoire causée par l'ETEC se développe après une période d'incubation de 1 à 2 jours et persiste pour une moyenne de 3 à 5 jours. Les symptômes (diarrhée aqueuse, non-sanguinolente, crampes abdominales ; avec moins de nausées et de vomissements) sont semblables à ceux du choléra, mais sont généralement plus doux, bien que la mortalité soit élevée chez les individus mal nourris avec des maladies sous-jacentes, en particulier les enfants et les personnes âgées.

La maladie nécessite une fixation bactérienne dans l'épithélium de l'intestin grêle par des protéines de surface bactérienne (facteurs de colonisation [CF]) et l'élaboration d'entérotoxines thermodurcissables et thermostables.

Les gènes pour les facteurs de colonisation et les entérotoxines sont codés sur un plasmide transmissible. Les facteurs de colonisation sont subdivisés en familles (CFA / I, CFA / II, CFA / IV sont les plus courants) et plus loin subdivisés par leurs propriétés antigéniques (antigènes de surface de coli [CS]). Plus de 20 facteurs de colonisation (CS) ont été décrits et la spécificité de l'hôte est définie par leur affinité pour les récepteurs sur des cellules hôtes.

ETEC produit deux classes d'entérotoxines : les toxines stables à la chaleur (*STa* et *STb*) et les toxines thermo-instables (*LT-I*, *LT-II*).

La toxine *STa* stable à la chaleur mais pas le *STb* est associée à la maladie de l'être humain, se trouve entre 75% et 80% des souches ETEC, seul ou associé à *LT*, et est communément responsable de plus de maladies graves que les souches ETEC uniquement *LT*. *STa* est un petit peptide monomère qui se lie au guanilate transmembranaire cyclase C sur l'épithélium intestinal, menant à une augmentation de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP) et l'hypersécrétion subséquente des fluides ainsi que l'inhibition de l'absorption des fluides. Parmi les toxines thermolabiles, *LT-I* est plus communément associé à une maladie humaine. *LT-I* est fonctionnellement et structurellement similaire à la toxine du choléra (80% d'homologie) et se compose d'une sous-unité A et de cinq identiques B sous-unités. Les sous-unités B se lient aux mêmes récepteurs que le choléra la toxine (gangliosides GM1), ainsi que d'autres glycoprotéines de surface sur les cellules épithéliales dans l'intestin grêle. Après l'endocytose, la sous-unité A se déplace à travers la membrane de la vacuole et interagit avec une protéine de membrane (Gs) qui régule l'adénylate cyclase. L'effet net de cette interaction est une augmentation du niveau de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), ce qui entraîne une sécrétion accrue de chlorure et une diminution de l'absorption de sodium et de chlorure. Ces changements se manifestent par une diarrhée aqueuse. L'exposition à la toxine stimule également la sécrétion de prostaglandines et la production de cytokines inflammatoires, entraînant une perte de fluide supplémentaire.

I.2.6.1.2 *E. coli* enteropathogène

Deux groupes d'*E. coli* responsables de la maladie entérique (Enteropathogène *E. coli* [EPEC] et certains *E. coli* producteurs de Shiga toxine [STEC]) possèdent un groupe de gènes de virulence localisés sur un îlot de pathogénicité chromosomique appelée locus d'effacement des entérocytes (LEE). Les bactéries hétérogènes du groupe EPEC étaient les premières souches d'*E. coli* associée à des épidémies de maladies diarrhéiques signalées dans les années 1940 et 1950. Ils étaient à l'origine caractérisés par la spécificité des sérotypes responsables de chaque épidémie, mais sont maintenant définis par (62) la présence de LEE et (63) l'absence de Shiga toxine. Les EPEC sont subdivisés en souches typiques et atypiques basées sur la présence ou l'absence du facteur d'adhérence d'*E. coli* (EAF) plasmidique. Les maladies sporadiques et les épidémies sont relativement peu communes dans les pays développés et sont maintenant signalés seulement sporadiquement dans les pays appauvris, avec une maladie principalement chez les nourrissons et le plus souvent associé aux souches atypiques. La maladie est transmise par une exposition fécale-orale aux surfaces contaminées ou aux produits alimentaires. Les humains sont les seules sources de souches typiques, alors que les humains et une variété d'animaux hôtes sont des réservoirs de souches atypiques.

L'infection est initiée par l'attachement bactérien à l'épithélium des cellules de l'intestin grêle, avec effacement ultérieur (Destruction) du microvillus (attachement / effacement [A / E] histopathologie). L'agrégation initiale des typiques EPEC conduisant à la formation de micro colonies sur la surface des cellules épithéliales est médiée par un plasmide codant le faisceau de formation des pili (BFP) pour bundle-forming Pili ; Cependant, ce plasmide n'est pas présent chez l'EPEC atypique. Les étapes ultérieures de l'attachement sont régulées par des gènes codés sur l'îlot de pathogénicité LEE. Cet îlot de plus de 40 gènes est responsable de la fixation et de la destruction de la surface de la cellule hôte. Suite à l'attachement dénoué, une active sécrétion de protéines bactériennes dans la cellule épithéliale de l'hôte survient par les systèmes de sécrétion de type III bactériens. Une protéine, la translocated intimin receptor (Tir), est insérée dans la membrane de la cellule épithéliale et fonctionne comme un récepteur pour une membrane externe d'adhésion bactérienne, intimine. La liaison de l'intimin au Tir résulte de la polymérisation de l'actine, accumulation d'éléments cytosquelettiques sous les bactéries attachées, perte de l'intégrité de la surface cellulaire, et la mort cellulaire éventuelle.

La maladie survient principalement chez les enfants de moins de 2 ans et se caractérise par une diarrhée aqueuse qui peut être sévère et prolongée et souvent accompagné de fièvre et de vomissements. Le début de la maladie peut être aussi rapide, quelques heures après

L'ingestion d'EPEC, et bien que la plupart des infections se résolvent après quelques jours, une diarrhée persistante nécessitant une hospitalisation peut arriver.

I.2.6.1.3 *E. coli* Enteroaggregative

E. coli Enteroaggregative (EAEC) est une collection hétérogène de souches caractérisées par leur autoagglutination en une « briques empilées » un arrangement sur l'épithélium de l'intestin grêle et, dans certains cas, le côlon. La prévalence de la maladie causée par la EAEC

n'est pas claire car aucune molécule marqueur de ces bactéries n'a été découvert. Les gènes codant les adhésines, les toxines y compris la Shiga toxine et d'autres protéines de virulence sont très variables chez les EAEC. Cependant, des analyses complètes des épidémies dans les pays développés et en développement ont démontré que ces bactéries sont communes. Des foyers de gastro-entérites causées par la EAEC ont également été signalé aux États-Unis, en Europe et au Japon et sont probablement une cause importante de diarrhées infantiles dans les pays développés. Il s'agit d'une des quelques bactéries associées à la diarrhée chronique et au retard de croissance chez les enfants. Caractéristique, suivant l'adhésion à l'épithélium, la libération de cytokines est stimulée, ce qui se traduit par une production de neutrophiles et une progression vers une diarrhée inflammatoire. La maladie se caractérise par une diarrhée sécrétoire aqueuse, souvent avec des cellules inflammatoires et accompagné de fièvre, de nausées, de vomissements et de douleurs abdominales. Ce processus peut être aigu ou progresser vers une diarrhée persistante, en particulier chez les enfants et les personnes infectées par le VIH.

I.2.6.1.4 *E. coli* producteur de Shiga Toxine

La nomenclature pour ce groupe d'*E. coli* est confuse, on se réfère à eux comme *E. coli* produisant des shiga toxines (STEC), *E. coli* produisant des verocytotoxines (VTEC) et entérohémorragique *E. coli* (EHEC). Pour donner une certaine clarté, considérez VTEC un nom périmé et EHEC un sous ensemble de STEC. Tous les membres de ce groupe sont définis par la présence de Shiga toxine 1 (Stx1) ou 2 (Stx2). Certaines souches EHEC, mais pas toutes, sont LEE positif et forment une cytopathologie A / E, ressemblant aux souches EPEC. La classification de la STEC est compliquée car le sérotype le plus fréquent associé à la maladie humaine est O157 : H7, et les premiers efforts pour diagnostiquer la maladie étaient de déterminer si l'agent pathogène présumé était ce sérotype. Il est maintenant précis que O157 : H7 est le plus commun sérotype associé à une grave maladie humaine, il représente moins de 50% des sérotypes responsables. En outre, les sérotypes prédominants varieront géographiquement. Ainsi, le diagnostic de la maladie STEC est maintenant basé sur la détection de la Shiga toxines plutôt que le sérotypage des isolats soupçonnés.

Divers programmes nationaux ont été mis en place par les États-Unis, le Canada, l'Europe et l'Australie pour surveiller les maladies d'origine alimentaire et ont documentés une prévalence généralisée de la maladie de STEC dans ces pays, ainsi que dans d'autres pays où les épidémies ont été documentées. Il est estimé que ces bactéries provoquent 73 000 d'infections et 60 décès chaque année aux États-Unis, bien que la connaissance de ces agents pathogènes soit maintenant associée à une diminution globale de la prévalence. La maladie STEC est la plus fréquente dans les mois de chaleur, et la plus forte incidence est chez les enfants âgés de moins de 5 ans. La plupart des infections sont attribuées à la consommation de viande hachée ou autres produits à base de viande hachée, eau, lait non pasteurisé ou jus de fruits (par exemple, cidre de pommes contaminées par des excréments de bovins), des légumes comme les épinards et les fruits. L'ingestion de moins de 100 bactéries peut provoquer une maladie et survient la propagation de personne en personne.

La maladie causée par STEC varie de douce diarrhée sans complication à la colite hémorragique avec une douleur abdominale sévère et la diarrhée sanglante. La maladie grave est plus fréquemment associée à STEC O157 : H7. Au début de la diarrhée la douleur à l'abdomen se développe chez les patients après 3 à 4 jours d'incubation. Les vomissements sont observés chez environ la moitié des patients, mais une fièvre élevée est généralement absente. Dans les 2 jours suivant l'apparition, la maladie chez 30% à 65% des patients évolue vers une sanglante diarrhée avec des douleurs abdominales sévères. La résolution complète des symptômes se produit généralement après 4 à 10 jours dans la plupart des cas chez les patients non traités. Le syndrome urémique hémolytique (HUS), un trouble caractérisé par une insuffisance rénale aiguë, une thrombopénie, et l'anémie hémolytique micro-angiopathique, est une complication chez 5% à 10% des enfants infectés de moins de 10 ans. La résolution des symptômes se produit en simple maladie après 4 à 10 jours chez la plupart des patients non traités ; cependant, la mort peut se produire chez 3% à 5% des patients atteints de HUS, et des séquelles sévères (insuffisance rénale, hypertension, des manifestations du système nerveux central [CNS]) peuvent se produire chez environ 30% des patients HUS.

Stx1 est essentiellement identique à la toxine Shiga produite par *Shigella dysenteriae* (ainsi la source du nom) ; Stx2 a une homologie de 60%. Les deux toxines sont acquises par lysogenic bactériophages. Les deux ont une sous-unité A et cinq sous-unités B, avec les sous-unités B liées à un glycolipide spécifique sur la cellule hôte (globotriaosylceramide [Gb3]). Une forte concentration des récepteurs Gb3 se retrouve dans les villosités intestinales et les cellules de l'endothélium rénales. Une fois la sous-unité A intériorisée, elle est clivée en deux molécules, et le fragment A1 se lie à 28S ARNr et provoque une cessation de la synthèse des protéines. Les souches STEC producteurs de Shiga toxines et d'activité attachement et effacement sont plus pathogènes que les souches produisant un seul shiga toxine. HUS a été préférentiellement associé à la production de Stx2, qui a démontré qu'il détruisait le glomérulaire des cellules endothéliales. Les dommages aux cellules endothéliales conduisent à l'activation des plaquettes et le dépôt de thrombine qui aboutit à une diminution de la filtration glomérulaire et une insuffisance rénale aiguë. Les shiga toxines stimulent également l'expression de cytokines inflammatoires (Par exemple, facteur de nécrose tumorale TNF- γ , interleukine (IL-6), améliorant l'expression du récepteur de la sous-unité B Gb3.

1.2.6.1.5 *E. coli* Entero-invasive

Les souches *E. coli* Entero-invasives (EIEC) sont rares aussi bien dans les pays développés que ceux en développement. Les souches pathogènes sont principalement associées à quelques sérotypes O isolés : O124, O143 et O164. Les souches sont étroitement liées à *Shigella* par leurs propriétés phénotypiques et pathogéniques. Les bactéries sont capables d'envahir et de détruire l'épithélium colique, produisant une maladie caractérisée initialement par une diarrhée aqueuse. Une minorité des patients évolue vers la forme dysentérique de la maladie, consistant en fièvre, crampes abdominales, sang et des leucocytes dans les échantillons de selles.

Une série de gènes sur un plasmide intervient dans une invasion bactérienne (Gènes pInv) dans l'épithélium colique. La bactérie alors lyse la vacuole phagocytaire et se reproduit dans le cytoplasme cellulaire. La circulation dans le cytoplasme et dans les zones adjacentes des cellules épithéliales est régulée par la formation d'une queue d'actine (similaire à celle observé avec *Listeria*). Ce processus de cellule épithéliale la destruction avec infiltration inflammatoire peut progresser à l'ulcération du côlon.

I.2.6.2 Infections extra-intestinales

I.2.6.2.1 Infection urinaire

La plupart des bacilles Gram négatives qui produisent des UTI proviennent du côlon, contaminent l'urètre, montent dans la vessie et peuvent migrer vers le rein ou la prostate. Bien que la plupart des souches de *E. coli* peuvent produire des infections urinaires, la maladie est plus fréquente avec certains sérogroupes spécifiques. Ces bactéries sont particulièrement virulentes en raison de leur capacité à produire des adhésines (principalement P pili, AAF / I, AAF / III et Dr) qui se lient aux cellules recouvrant la vessie et les voies urinaires supérieures (prévient l'élimination de la bactérie dans l'urine) et l'hémolysine HlyA qui lyse les érythrocytes et d'autres types de cellules (conduisant à la libération de cytokine et la stimulation d'une réponse inflammatoire).

I.2.6.2.2 Méningite néonatale

E. coli et les streptocoques du groupe B provoquent la majorité des infections du SNC chez les nourrissons de moins d'un mois. Approximativement 75% des souches d'*E. coli* possèdent l'antigène capsulaire K1. Ce séro groupe est également couramment présent dans les parcelles GI des femmes enceintes et des nouveau-nés. Cependant, la raison pour laquelle ce séro groupe a une prédilection pour traverser la barrière du sang au cerveau et causer la méningite chez les nouveau-nés n'est pas comprise.

I.2.6.2.3 Septicémie

Typiquement, la septicémie causée par des bacilles Gram-négatives, telles que *E. coli*, provient le plus souvent d'infections dans le tractus urinaire ou gastro-intestinal (par exemple, une fuite intestinale lors d'infection intra-abdominale). La mortalité associée à une septicémie par *E. coli* est élevée chez les patients dont l'immunité est compromise ou l'infection primaire est dans l'abdomen ou CNS.

I.2.7 Diagnostic des infections à EHEC / ETEC

Le diagnostic repose, d'une part, sur la mise en évidence, directement à partir des selles et/ou après culture, des principaux gènes de virulence des EHEC (*stx* et *eae*) et, d'autre part, sur la présence d'anticorps spécifiques antilipopolysaccharide (anti-LPS) (67) (Figure 9).

Les indications d'une recherche d'EHEC dans les selles sont les suivantes :

- diarrhée sanglante ou glairo-sanglante chez des patients pour lesquels la recherche de *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* et *Campylobacter* s'est révélée négative ;

- en cas de suspicion de SHU ou de MAT.

Cependant, ce critère strict de selles sanglantes peut amener à méconnaître le diagnostic. En effet, en France, la diarrhée est sanglante dans moins de 60 % des cas de SHU (66).

PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*

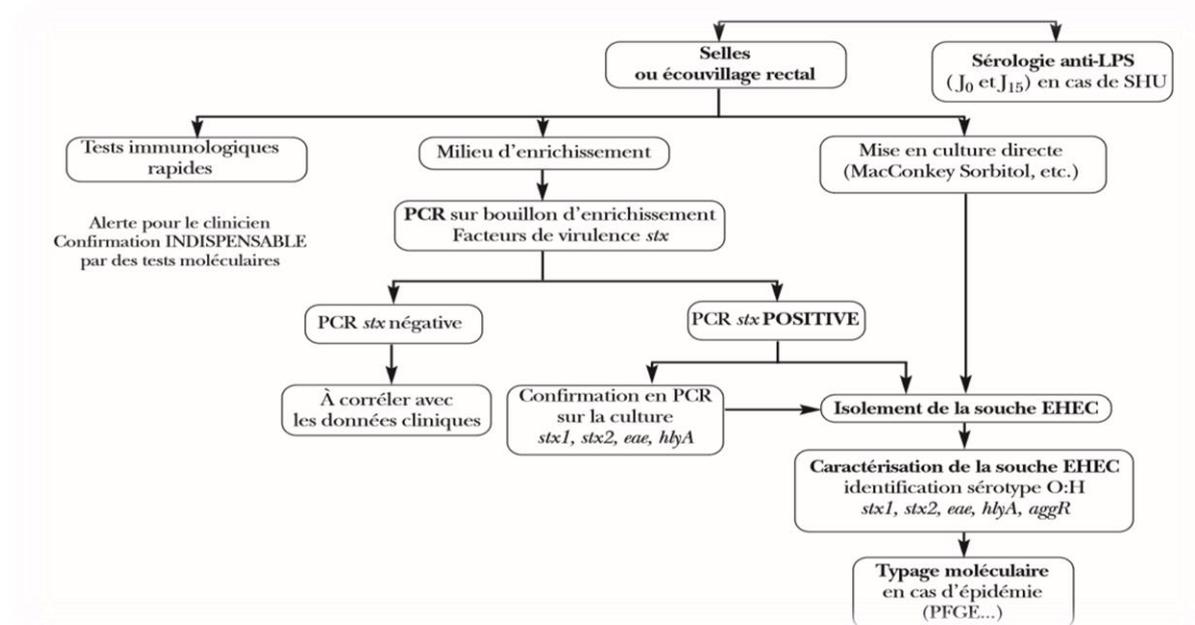


Figure 9 : Diagnostic d'une infection à EHEC. D'après (67).

I.2.7.1 Prélèvements

Le diagnostic des infections à EHEC est difficile, ces bactéries étant rapidement éliminées du tube digestif. La quantité présente dans les selles est très faible (< 102UFC/g de selles), surtout au moment du SHU. Une étude réalisée par Tarr *et al.* a montré qu'au cours d'un SHU, le recueil des selles doit s'effectuer au maximum 4 à 6 jours après le début des prodromes digestifs pour que l'analyse soit contributive (68). Les selles peuvent être recueillies également par écouvillonnage rectal, les patients admis pour SHU présentant souvent un arrêt du transit intestinal. Le prélèvement doit être fait avant toute prise d'antibiotique et doit être transporté rapidement au laboratoire, ou conservé à + 4°C et envoyé dans un milieu de transport si l'analyse n'est pas réalisée sur place.

I.2.7.2 Mise en évidence des toxines et des gènes de virulence

I.2.7.2.1 Effet cytopathogène

La technique de référence pour la recherche de toxines Stx libres dans les selles ou sur des souches isolées, est la cytotoxicité sur cellules Vero ou HeLa, qui doit être neutralisée par un antisérum anti-Stx pour affirmer que la cytotoxicité observée est bien liée à la présence d'une activité toxique de type Stx. Ce test est spécifique, mais il est difficile à mettre en œuvre et ne peut être effectué qu'en laboratoire spécialisé (69).

I.2.7.2.2 Méthodes moléculaires

Compte tenu de la présence en très faible quantité des EHEC dans les selles, l'amplification génique *in situ* par PCR des gènes *stx* et/ou du gène *eae* représente une méthode de choix. Elle constitue la méthode la plus sensible pour détecter les EHEC à partir des selles, généralement après un enrichissement de 4 à 6 heures en eau peptonée.

De très nombreux systèmes de PCR ont été décrits. Les gènes *stx* (*stx1*, *stx2* et variants) et *eae* peuvent être recherchés séparément ou par PCR multiplex. Les méthodes de PCR en temps réel permettent un diagnostic plus rapide que les méthodes conventionnelles de PCR (70).

En cas de positivité de la PCR, l'isolement de la bactérie est indispensable dans un but épidémiologique, mais aussi pour caractériser les facteurs de pathogénicité de la souche en cause, et en particulier les variants *stx* considérés comme un facteur prédictif de sévérité des infections à EHEC.(71)

Cependant, l'isolement de la souche est parfois très difficile et nécessite de pratiquer de nombreuses PCR sur colonies isolées. Dans un cas sur 10, cette recherche peut malgré tout s'avérer infructueuse.

I.2.7.3 Tests immunologiques

De nombreux tests immunologiques permettent la détection des EHEC directement dans les selles ou après une phase d'enrichissement en bouillon : tests EIA (*Enzyme ImmunoAssay*), OIA (*Optical ImmunoAssay*), immunochromatographie, etc. (Tableau VI). Ces tests détectent l'antigène O157 et/ou les toxines Stx. Ils doivent être utilisés selon les instructions strictes des industriels. Ils sont faciles à mettre en œuvre et constituent, lorsqu'ils sont positifs, une alerte pour le clinicien ; cependant, bien qu'ayant une bonne sensibilité et une bonne spécificité, leur lecture est parfois difficile et ils peuvent donner des résultats faussement positifs par des réactions croisées avec des virus entériques ou d'autres bactéries. Ils doivent toujours être confirmés par des méthodes moléculaires illustration dans les figures 10 et 11 (11, 23).

Tableau VI : Tests immunologiques de détection des EHEC dans les selles ou le bouillon d'enrichissement (20).

Test	Laboratoire	Méthode	Cible	Spécimen ^(a)
BioStar OIA SHIGATOX	Inverness Medical	OIA (Optical ImmunoAssay)	Toxines Stx (sans distinction Stx1 et 2)	Selles Bouillon d'enrichissement
Duopath® Verotoxins GLISA test	Merck	GLISA (Gold Labelled ImmunoSorbent Assay)	Stx1 et Stx2	Selles Bouillon d'enrichissement
ImmunoCard STAT!® EHEC	Meridian Biosciences	Immuno chromatographie	Stx1 et Stx2	Bouillon d'enrichissement
RIDA®QUICK Verotoxin / O157 Combi	R-Biopharm	Immuno chromatographie	Antigène O157 Toxines Stx (sans distinction Stx1 et 2)	Bouillon d'enrichissement
SHIGA TOXIN QUIK CHEK	Alere	Immuno chromatographie	Stx1 et Stx2	Selles Bouillon d'enrichissement

^(a) Utilisation possible à partir des souches pour les tests BioStar OIA SHIGATOX et Duopath® Verotoxins GLISA test.

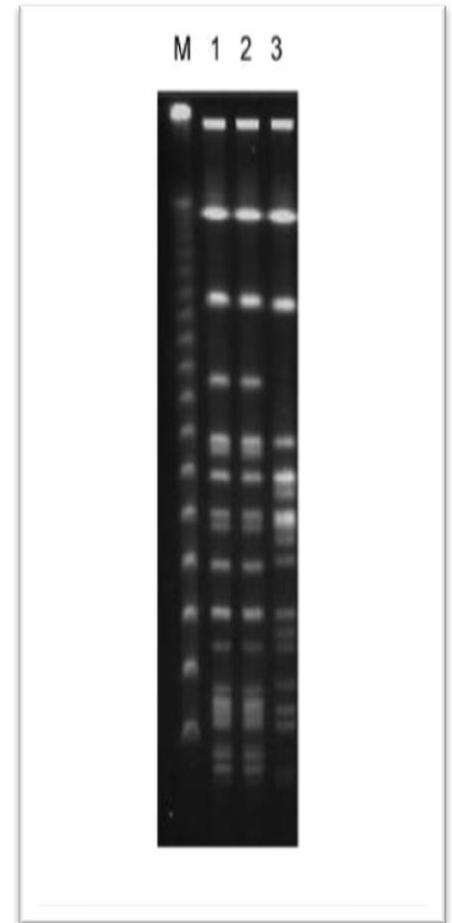
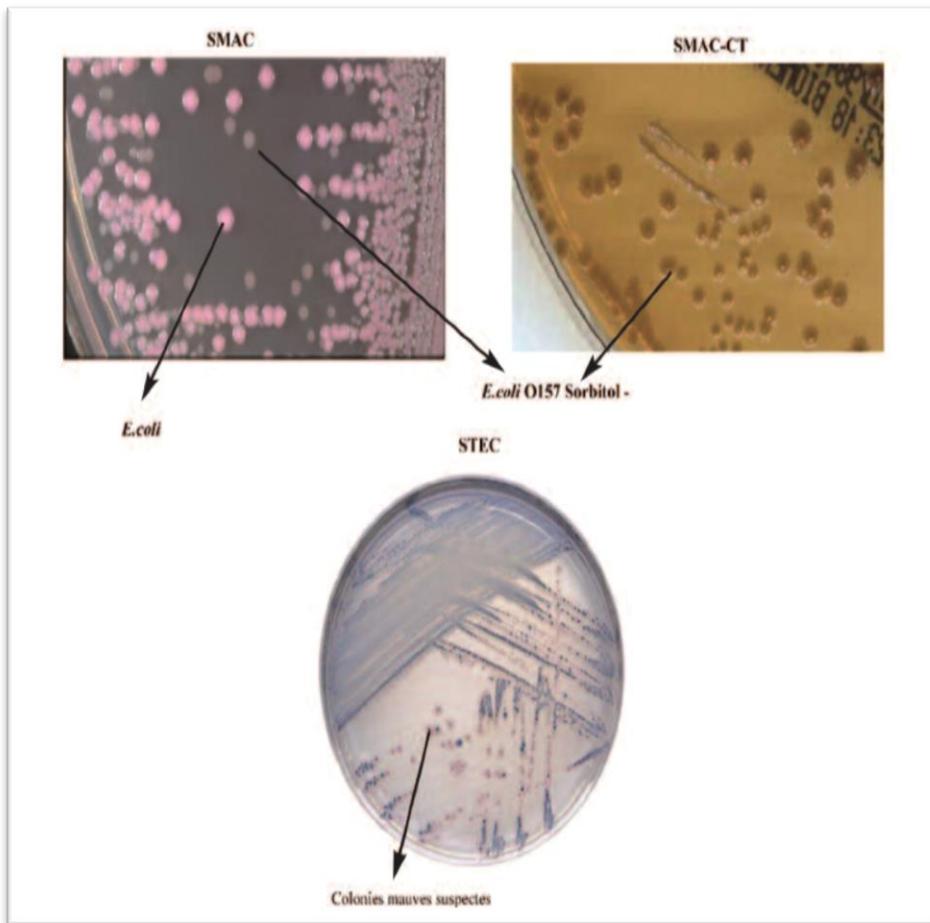


Figure 10 : Morphologie des colonies d'*E. coli* O157:H7 sur les milieux SMAC, SMAC-CT et STEC.

Figure 11 : Pulsotypes d'*E. coli* O104:H4 (digestion enzymatique par *NotI*).

D'après (71).

Piste 1 : souche représentative de l'épidémie allemande ; piste 2 : souche représentative de l'épidémie française ; piste 3 : souche non reliée ;

M : marqueurs de poids moléculaire.

I.2.7.4 Isolement et caractérisation des souches

Les EHEC étant présents en quantité parfois très faible dans les selles, il est indispensable de réaliser un enrichissement des selles. En médecine humaine, il est classique d'utiliser de l'eau peptonée tamponnée, additionnée de vancomycine (inhibition de la croissance des bactéries à Gram positif). Après cette phase d'enrichissement de 4 à 6 heures, la selle est mise en culture sur des milieux spécifiques (71).

EHEC de sérotype O157:H7

La plupart des souches d'EHEC O157:H7 ne fermentent pas le sorbitol et ne produisent pas de beta-glucuronidase, ce qui permet l'utilisation de milieux dédiés comme le milieu de Mac Conkey Sorbitol (SMAC) ou le milieu de Mac Conkey Sorbitol – CT (Céfixime-Tellurite),

sur lesquels les colonies suspectes apparaissent transparentes ; des souches d'EHEC O157:H7 fermentant le sorbitol ont cependant été décrites. Des milieux chromogènes pour la détection des souches O157 ont également été développés, comme le milieu CHROM agar O157, sur lequel les EHEC O157:H7 donnent des colonies mauves (Figure 10).

Dans tous les cas, les colonies suspectes doivent être agglutinées par un sérum anti-O157 (et éventuellement H7), et il faut confirmer qu'elles appartiennent bien à l'espèce *E. coli* (70).

EHEC non O157

Les EHEC non O157 n'ont aucune propriété biochimique commune permettant leur détection sur un milieu particulier. On utilise les milieux traditionnels pour les bactéries entéropathogènes (Drigalski, Hektoen), ainsi que des milieux chromogènes pour entérobactéries ou des milieux chromogènes permettant la mise en évidence de certains sérotypes d'EHEC, par exemple le milieu STEC qui permet d'isoler les bactéries productrices de toxines Stx (colonies mauves). La recherche des EHEC non O157 nécessite d'avoir recours à des méthodes moléculaires pour rechercher les gènes de virulence. L'utilisation de gélose au sang de mouton permet également la mise en évidence de l'entérohémolysine, présente chez environ 85 % de EHEC.

Le sérotypage O des souches peut être utile. Il consiste en l'agglutination des colonies à l'aide des sérums spécifiques anti-O (dirigés contre le LPS), permettant de détecter certains sérotypes connus pour être des EHEC (ex. : O26, O111, O55, O145, etc.). Lorsque ce test est positif pour l'un des sérotypes, la recherche des gènes de virulence doit être pratiquée. Le sérotypage H (sérums dirigés contre des antigènes de flagelle) peut être réalisé secondairement. Il est indispensable pour les études épidémiologiques.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques ne doit pas être réalisée en routine. En effet, actuellement, l'utilisation d'antibiotiques n'est pas recommandée dans les diarrhées à EHEC, car elle constitue un facteur de risque de déclenchement d'un SHU par libération de toxines Stx.

L'isolement des souches est indispensable pour des études d'épidémiologie moléculaire (« pulstypie », « Rep-PCR », « MLVA », etc.) (Figure 11), afin de déterminer l'origine d'une épidémie (comparaison avec les souches animales ou alimentaires), ou de différencier les cas sporadiques des cas épidémiques.

I.2.7.5 Sérodiagnostic

Dans la majorité des cas, les malades développent des anticorps anti-LPS, dont la détection est réalisée sur un sérum précoce et le cas échéant un sérum tardif, afin d'observer une augmentation du titre des anticorps attestant de l'infection. L'importance de la réponse immunitaire est directement liée à la sévérité de la maladie.

La détection des anticorps anti-LPS de 8 sérogroupes (O157, O26, O91, O103, O111, O128, O145, O104) est réalisée au Centre National de Référence (CNR) *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (Institut Pasteur, Paris). Les 3 classes d'anticorps (IgG, IgM et IgA) sont détectables précocement, à un titre souvent très élevé, et permettent d'attester de l'infection même plusieurs semaines après le début des prodromes digestifs.

La recherche de ces anticorps est indispensable pour le diagnostic et pour des études épidémiologiques lorsque la mise en évidence directe des gènes codant pour les toxines Stx et/ou des EHEC dans les selles est négative, ou n'a pas pu être réalisée (67).

I.2.8 Traitement des infections à EHEC

I.2.8.1 Traitement préventif

Les mesures de prévention des infections à EHEC, pourtant très bien expliquées dans la fiche d'information éditée en 2006 par l'InVS (<http://www.invs.sante.fr>), restent malheureusement mal connues des jeunes parents, et même des professionnels s'occupant de jeunes enfants.

Des précautions aussi simples que la cuisson à cœur des steaks hachés, la règle de ne jamais donner de produits laitiers (ou autres) non pasteurisés aux jeunes enfants, et le lavage des mains, doivent être rappelées aux parents et à ceux qui s'occupent de jeunes enfants.

Actuellement, le traitement reste purement symptomatique.

I.2.8.2 Les antibiotiques au stade de l'infection gastro-intestinale

Plusieurs études rétrospectives et prospectives suggèrent que les antibiotiques augmentent le risque de SHU, probablement par relargage des toxines Stx lors de la lyse bactérienne. Une méta-analyse de 20 études (~ 2 500 patients) qui ont comparé le risque de développer un SHU selon que le patient avait ou non reçu des antibiotiques au stade de la diarrhée, n'a pas permis de conclure. À ce jour, il est donc recommandé de ne pas donner d'antibiotiques aux patients ayant une diarrhée à EHEC (71).

I.2.8.3 Traitements de demain

Plusieurs traitements sont à l'étude.

I.2.8.3.1 Traitements neutralisant les toxines Stx

Il existe plusieurs approches de ce type, basées sur l'utilisation de polymères du récepteur Gb3 administrés par voie orale, d'analogues solubles du récepteur Gb3 administrés par voie intraveineuse, ou encore de probiotiques donnés par voie orale qui produisent un analogue du récepteur Gb3. Ces substances protègent la souris de doses létales d'EHEC (71). Des études chez l'homme sont en cours.

I.2.8.3.2 Anticorps monoclonaux humanisés anti-Stx

Les anticorps monoclonaux anti-Stx préviennent la toxicité des toxines Stx sur cellules HeLa, prolongent la survie des souris infectées par des EHEC, et sont efficaces dans le modèle de SHU chez le cochonnet (survie de 90 % chez les animaux traités *versus* 10 % chez les contrôles non traités).

I.2.8.3.3 Anticorps monoclonaux inhibant l'activation du complément

L'utilisation d'un anticorps monoclonal inhibant l'activation du complément (Eculizumab) a récemment montré son efficacité dans le traitement du SHU post-diarrhée sévère de l'enfant (71). Des études complémentaires sont en cours chez l'homme.

II. DEUXIEME PARTIE : Étude expérimentale

II.1 CHAPITRE I : Matériel et Méthodes

II.1.1 Matériel

II.1.1.1 Matériels biologiques

Il s'agit de prélèvements de selles effectués chez des enfants de moins de cinq ans reçus sur nos sites retenus pour des épisodes de diarrhées.

II.1.1.2 Matériel d'étude de laboratoire

Le matériel utilisé pour les examens bactériologiques classiques, l'extraction d'ADN, l'amplification génique, l'électrophorèse et la révélation des produits amplifiés est listé dans l'annexe.

II.1.2 Méthodes

II.1.2.1 Cadre, type et durée de l'étude

Les centres de santé communautaires : ASACOSIK1, ASACOBOUL1, ASACOTOQUA, et ASACOSAB1 nous ont servi de cadre d'étude. Il s'agit d'une étude prospective transversale et descriptive. La conception de l'étude, le collecte, l'analyse bactériologique des échantillons, les mises au point des PCR et les travaux de recherche se sont déroulés de février 2016 à aout 2017.

II.1.2.2 Critères d'inclusion et d'exclusion

Ont été inclus, tout enfant présentant de la diarrhée répondant à la définition de cas, âgé de 0 à 59 mois et dont les parents ont librement donné leur assentiment. Ont été retirés de l'étude les enfants chez qui des prélèvements de selles n'ont pas pu être réalisés.

II.1.2.3 Population d'étude

L'étude concernait les enfants âgés de 0 à 59 mois reçus en consultation pour des épisodes de diarrhées sur nos dits sites.

II.1.2.4 Définition de la diarrhée :

Selon l'OMS la diarrhée se définit comme l'émission d'au moins trois selles molles ou liquides par jour, ou à une fréquence anormale pour l'individu. Elle est généralement le symptôme d'une infection gastro-intestinale, qui peut être due à diverses bactéries, divers virus ou parasites.

Réf : <http://www.who.int/topics/diarrhoea/fr/>

II.1.2.5 Taille de l'échantillon

Notre étude a adopté un échantillonnage en mode de sélection systématique. 120 échantillons ont été collectés et traités.

II.1.2.6 Collecte des données

Les patients admis pour syndrome diarrhéique sur les sites choisis ont bénéficié d'une consultation au cours de laquelle ont été recueillies à partir d'un questionnaire anonyme (voir annexe) les données :

- ✓ Socio démographiques (âge, sexe, début de la maladie, résidence) ;
- ✓ Cliniques (température, état de déshydratation, vomissements, frissons) ;
- ✓ Les facteurs de risques liés à la diarrhée (approvisionnement en eau, nombre d'enfants vivant dans la maison, disponibilité de latrines domestique).

II.1.2.7 Prélèvement et transport des échantillons

Les selles ont été recueillies dans des pots stériles pré positionnés sur les sites et conditionnés par les techniciens de laboratoire du site et des milieux de transport Cary Blair ont été ensemencés. Les échantillons ont été transportés à l'INRSP à +4°C dans les caisses isothermes. Chaque échantillon était accompagné du questionnaire portant les informations sur le patient.

II.1.2.8 Coproculture standard

Une coproculture standard a été effectuée sur chaque échantillon selon les SOPs en cours dans le laboratoire de bactériologie. La recherche de *Salmonella* et de *Shigella* réalisée sur gélose Hektoen et/ou SS avec un enrichissement préalable dans le bouillon de sélénite de sodium. La gélose EMB a été utilisée pour l'isolement d'*Escherichia coli* en raison de son aspect caractéristique (violet foncé en de scarabée) sur ce milieu.

L'identification biochimique a été faite sur API 20^E, suivie de typage par des tests sérologiques.

Un antibiogramme par diffusion sur gélose nous a permis de mesurer la sensibilité des souches à un groupe d'antibiotiques cibles.

II.1.2.9 Extraction de l'ADN génomique total

II.1.2.9.1 Remise en culture des souches

Les cultures bactériennes purifiées stockées à -80°C ont été décongelées dans un bac à glace pour éviter un choc thermique. Afin de favoriser le rendement, une goutte du bouillon turbide prise avec une anse a été inoculée sur de la Gélose M.H fraîchement préparée. Les souches remises en culture ont été ensuite incubées à la température optimale requise de 37°C pendant une nuit.

II.1.2.9.2 Extraction par thermolyse

L'extraction d'ADN bactérien a été réalisée par thermolyse libérant l'ADN bactérien par choc thermique. Quatre à cinq colonies bien isolées de la culture bactérienne ont été remises en suspension avec 200 µl d'eau distillée stérile. Le mélange a été chauffé dans de l'eau portée à ébullition pendant 10 minutes. Ensuite, il a été centrifugé à 12 000 tours par minute pendant 10 minutes. Le surnageant, ultérieurement utilisé comme matrice d'ADN, a été récupéré et conservé à -20°C.

II.1.2.10 Définition des témoins et des amorces utilisées

II.1.2.10.1 Définition des souches de référence et du témoin négatif

Pour toutes les réactions d'amplification génique, le témoin négatif a été constitué par le mélange réactionnel et de l'eau pour préparation injectable (PPI). Tandis que le témoin positif varie selon le gène à caractériser. Les souches constituant les témoins positifs étaient des souches de référence :

- E2348-69
- M90T
- 17.2
- EDL 933
- EDL 1493
- R3
- R4
- R5
- R6
- R7

II.1.2.10.2 Définition des amorces utilisées pour l'étude

Les amorces ont été utilisées en simplex. Des solutions filles d'amorces ont été préparées à partir de la solution mère afin de limiter les phases de congélation/décongélation pouvant altérer la qualité des amorces. Toutes ces solutions sont conservées à -20°C.

II.1.2.10.2.1 Détection des gènes de virulence

Afin d'évaluer le potentiel de virulence des souches, la distribution de huit gènes associés à la virulence de *E. coli* a été déterminée. Des PCR ont été réalisées avec les paires d'amorces *bfpF/bfpR*, *eaeF/eaeR*, *ipaHF/ipaHR*, *EaggF/EaggR*, *slt1F/slt1R*, *slt2F/slt2R*, *ltF/ltR* et *staF/staR*.

II.1.2.10.2.2 Détection des intégrons

Tous les isolats de la collection ont été examinés pour la présence du gène de l'intégrase associé à une classe d'intégon. Ils ont été testés pour la présence des intégrases de classe 1 (*intI1*), 2 (*intI2*) et 3 (*intI3*) en utilisant spécifiquement les paires d'amorces *int1F/int1R*, *int2F/int2R* et *int3F/int3R*.

II.1.2.10.2.3 Recherche des phénotypes et des gènes de résistance aux antibiotiques

Les phénotypes ont été déterminés après la lecture interprétative de l'antibiogramme selon la norme du CA-SFM version 2016.

La recherche des gènes de résistance a été fonction du profil d'antibiorésistance de chaque isolat. L'amplification par PCR a été utilisée pour détecter les gènes codant pour la résistance aux bêta-lactamines (*oxaA1*, *shv*, *tem*), aux phenicolés (*catA1*), aux cyclines (*Tet*) et aux quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*).

Les gènes ainsi que les amorces utilisées sont listés dans les tableaux VII à X.

Tableau VII : Liste des amorces pour la recherche des gènes de virulence d'*E. coli* par PCR

Amorces	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation	Taille attendue
<i>Bfp</i>	GAC ACC TCA TTG CTG AAG TCG CCA GAA CAC CTC CGT TAT GC	57°C	324 bp
<i>Eae</i>	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG	65°C	494 bp
<i>IpaH</i>	GAA AAC CTC CTG GTC CAT CAG G GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	53°C	424 bp
<i>Eagg</i>	ACG CAG AGT TGC CTG ATA AAG AAT ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	53°C	630 bp
<i>Slt 1</i>	TTT ACG ATA GCA TTC TCG AC CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	56°C	130 bp
<i>Slt 2</i>	CTT CAC GTC ACC ATA CAT AT ACG ATG TGG TTT ATT CTG GA	56°C	346 bp
<i>Lt</i>	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC	56°C	707 bp
<i>Sta</i>	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC	43°C	

Tableau VIII : Liste des amorces pour la recherche des intégrons dans les isolats de *E. coli*

Amorces	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation	Taille attendue
<i>Int 1</i>	ACATGTGATGGCGACGCA CGA ATTTCTGTCCTGGCTGGC GA	57°C	580 pb
<i>Int 2</i>	GTAGCAAACGACTGACGAAAT G CACGGATATGCGACAAAA AGG T	62°C	806 pb
<i>Int 3</i>	GCC CCG GCA GCG ACT TTC AG ACG GCT CTG CCA AAC CTG ACT	62°C	1200 pb

F : forward (sens); R : reverse (anti-sens)

Tableau IX : Les facteurs de pathogénicité en fonction des pathovars d'*E. coli*.

Pathovars	Syndrome Clinique	Gènes virulence associés
EPEC	Diarrhée aqueuse, aiguë et persistante	<i>bfp, eae</i>
EAEC	Diarrhée aqueuse, aiguë et persistante	<i>astA, aff/I</i>
EHEC	Diarrhée aiguë, colite hémorragique, SHU	<i>Stx, eae</i>
ETEC	Diarrhée cholériforme, diarrhée du voyageur	<i>lt, st</i>
EIEC	Dysenterie, diarrhée de l'adulte	<i>inv, IpaH</i>

Tableau X : Liste des amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance de *E. coli* aux antimicrobiens par PCR

Amorces	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation	Taille attendue
<i>OXA 1</i>	ATGAAAAACACAATACATATC	55°C	890 pb
	AATTTAGTGTGTTTAGAATGG		
<i>SHV</i>	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	55°C	800 pb
	GATTTGCTGATTTGCTCGG		
<i>TEM</i>	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	55°C	850 pb
	GACAGTTACCAATGCTTAATC		
<i>CatA 1</i>	CGCCTGATGAATGCTCCG	57°C	450 pb
	CCTGCCACTCATCGCAGTAC		
<i>Tet</i>	GTAGTAATTCTGAGCACTGTCCGC	55°C	956 pb
	CTGCCTGGACAACATTGCTT		
<i>QnrA</i>	TCAGCACAAGAGGATTTCTC	55°C	657 pb
	GGCAGCACTATTACTCCCA		
<i>QnrB</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	55°C	469 pb
	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
<i>QnrS</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA	55°C	417 pb
	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		

II.1.2.11. Préparation du mélange réactionnel

Le volume et la concentration finale de chaque réactif à utiliser ont été déterminés en fonction de la concentration initiale de la solution utilisée. Tous les produits nécessaires à la PCR ont été dégelés sur glace. Les éléments en contact avec les réactifs sont à usage unique. Le mélange réactionnel, appelé communément mix, est calculé pour l'ensemble des isolats à tester. Il a été préparé en ajoutant les réactifs les uns après les autres : les dNTPs, le couple d'amorces sens/anti-sens, le tampon, l'eau PPI, le chlorure de magnésium et l'enzyme (*Taq polymerase*) qui est introduite en dernier dans le mix. Le mélange réactionnel a été ensuite redistribué entre le témoin positif, les échantillons et le témoin négatif. L'ADN à amplifier est ajouté par la suite au mélange réactionnel. La réaction PCR a été réalisée dans des microtubes de 0,1 ml, pour un volume réactionnel de 25 µl dont la composition est donnée dans le tableau XI.

Tableau XI : Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex

Réactif	Concentration initiale	Volume par puits (µl)
H ₂ O	NA	14,25
Tampon	10X	2,5
MgCl ₂	25 mM	2
Amorce sens	10 mM	1,5
Amorce anti-sens	10 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,5
Taq polymérase	5 U/µl	0,25
Répartition du mix		22,5
Ajout d'ADN matrice		2,5

II.1.2.12. Paramétrage du thermocycleur

Le paramétrage consistait à intégrer les programmes d'amplification dans les thermocycleurs. Les différentes étapes d'amplification de l'ADN se déroulent par cycles successifs dans un thermocycleur programmé manuellement. Les paramètres variables sont le temps, la température de chaque étape d'amplification ainsi que le nombre de cycles., notamment la température d'hybridation, varie pour chaque amorce (Tableaux XII et XIII).

Tableau XII : Programme de la PCR pour détecter les facteurs de virulence

	Température (°C)	Durée (seconde)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	300	1
Dénaturation	95	30	} 35
Hybridation	*	30	
Elongation	72	60	
Elongation finale	72	600	1

* varie en fonction du couple d'amorces

Tableau XIII : Programme de la PCR pour détecter les gènes de résistance

	Température (°C)	Durée (seconde)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94	300	1
Dénaturation	94	30	} 35
Hybridation	*	30	
Elongation	72	60	
Elongation finale	72	600	1

* varie en fonction du couple d'amorces

II.1.2.13. Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Un gel d'agarose à 1,5% a été préparé soit 1,75 g d'agarose en poudre dissous dans 150 ml de solution de TAE. Le mélange a été chauffé au four à micro-onde pendant environ 3 minutes jusqu'à ébullition et obtention d'une phase homogène limpide. Puis dans l'agarose refroidie (50 °C dans un bain mari) encore liquide, 2 gouttes de bromure d'éthidium étaient ajoutées et la solution finale était coulée dans un support sur lequel était fixé un peigne formant les puits nécessaires au dépôt des amplicons. Le dépôt des échantillons a été réalisé selon un plan ; chaque puits a été chargé avec 12µl d'amplicons et 3µl de tampon de charge coloré au bleu de bromophénol. Pour chaque peigne, un puits a été également chargé avec 12µl de marqueur de poids moléculaire d'ADN (de 100 paires de base) mélangé avec du tampon de charge coloré, comportant plusieurs fragments d'ADN de taille connue et servant d'échelle de repères. Un courant électrique de 120 volts a été appliqué à la cuve pendant 60 minutes pour la séparation par migration électrophorétique des fragments.

II.1.2.14. Visualisation des produits de PCR

Après la migration, le gel et son support ont été retirés de la cuve. Le gel a été placé sur une plaque de révélation. Les produits d'amplification ont été visualisés par fluorescence du bromure d'éthidium sous ultraviolets à 312 nanomètres.

II.1.2.15. Traitement et analyse des données

Les données ont été saisies sur une base élaborée sur Excel 2013, leur analyse sur IBM SPSS Statistic 20., le pack office 2013 nous a permis de réaliser la rédaction de ce travail.

II.1.2.16. Considérations éthiques

II.1.2.16.1 Aprobation :

Le protocole a reçu l'approbation du comité d'éthique de l'INRSP avant sa mise en œuvre.

II.1.2.16.2 Confidentialité et anonymat :

Aucune donnée d'identification du patient n'a été utilisée lors de l'analyse. Le formulaire de collecte et la base de données électroniques ont été anonymes. Ils ne contiennent ni les noms, ni les adresses des patients. Chaque patient a été identifié dans l'étude par un nom de code unique suivi de son numéro de réception au labo. Les données ont été confidentielles et n'ont été communiquées à personne en dehors de l'équipe de l'étude. Seul le médecin traitant pour la prise en charge pouvait établir le lien entre le nom du patient et son identifiant.

II.1.2.16.3 Consentement éclairé :

L'adhésion à l'étude a été subordonnée à la signature d'un formulaire de consentement dument signé par les parents. (Ref : consentement éclairé des parents en annexe).

Le formulaire a été traduit en langue locale pour s'assurer de sa bonne compréhension par les parents et éviter toute ambiguïté. Le médecin en charge, expliqua au représentant légal (parent ou tuteur) de chaque patient les objectifs, les procédures de l'étude ainsi que les risques et les avantages potentiels. Il a été ensuite demandé aux représentants s'ils acceptaient que leurs enfants participent à l'étude. Si oui il leur a été demandé de signer le formulaire de consentement.

II.1.2.16.4 Risques et bénéfices :

- **Risques :** l'étude ne présente aucun risque pour les enfants car aucun acte médical n'est pratiqué. Les échantillons de selles ont été recueillis par le technicien de laboratoire ou l'infirmier avec l'assistance des parents ou par eux-mêmes.
- **Bénéfices :** Les examens de laboratoire seront gratuits pour les patients inclus dans l'étude. L'identification et la maîtrise des pathogènes causes de la diarrhée chez ces patients faciliteront leur prise en charge thérapeutique.

L'étude procure à la communauté scientifique et au Ministère de Santé et de l'Hygiène Publique, des éléments de prise de décision pour lutter contre les maladies diarrhéiques et l'émergence de résistance des bactéries aux antibiotiques.

II.1.2.16.5 Justice :

Les participants consentants ou non à l'étude bénéficieront des mêmes traitements sans distinctions de nationalité, de race, d'ethnie, de sexe ou de statut socio-économique.

II.1.2.16.6 Gestion des déchets :

Selon le Principe de responsabilité, toute personne qui manipule ou gère des substances dangereuses est éthiquement responsable de l'application du plus grand soin possible dans leur prise en charge.

La gestion des déchets a été faite selon la procédure en vigueur (collecte, transport et incinération) dans notre pays.

III. Résultats

Caractéristiques des patients

L'étude a porté sur des échantillons de coproculture de 120 patients vus pour des épisodes de diarrhée dans quatre CSCom ASACOSIK 1 (33 patients), ASACOBOUL 1 (12 patients), ASACOTOQUA (25 patients), et ASACOSAB 1 (50 patients) du district. L'âge des patients varie d'un (2 patients) à 48 mois (1 patient). La diarrhée, définie comme étant l'émission d'au moins trois selles liquides ou molles par jour était présente chez l'ensemble des 120 patients reçus (100%). Nos données sur caractéristiques sociodémographiques sont traitées dans le tableau XIV.

Tableau XIV: Caractéristiques sociodémographiques des patients

Caractéristiques (n=120)		Effectif	Pourcentage
Sites	ASACOBOUL 1	12	10,0
	ASACOSAB 1	50	41,7
	ASACOSIK 1	33	27,5
	ASACOTOQUA	25	20,8
Tranches d'âges	(0-6) mois	16	13,3
	(7-12) mois	56	46,7
	(13-18) mois	25	20,8
	(19-24) mois	18	15
	(25 <) mois	5	4,2
Sexe	Féminin	43	35,8
	Masculin	74	61,7
Mode d'approvisionnement en eau de boisson	Eau minérale	9	7,5
	Borne fontaine	12	10
	Marigot	2	1,7
	Robinet à domicile	89	74,2
	Puits	21	17,5
	Autre mode	1	0,8

Le CSCom de Sabalibougou nous a offert le plus grand nombre de patients, La répartition des patients en fonction des sexes nous a donné Une prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,72. leur répartition en fonction des tranches d'âge montre que 60% des patients étaient âgés de moins de 12 mois avec une prédominance dans la tranche d'âge de 7-12 mois représentant 46.7%.

Tableau XV : Aspects thérapeutiques avant le prélèvement

Traitement administré (n=120)	Effectif	Pourcentage
Antibiothérapie		
Non	32	26,7
Oui	29	24,2
Déparasitant		
Non	28	23,3
Oui	13	10,8
SRO		
Non	77	64,2
Oui	13	10,8
Autre traitement		
Non	44	36,7
Oui	52	43,3

Les signes cliniques observés sont donnés dans les tableaux XVI et XVII.

Tableau XVI : Répartition de la population selon les signes observés associés à la diarrhée.

Signes associés à la diarrhée (n=120)	Effectif	Pourcentage
Vomissement		
Non	68	56,7
Oui	50	41,7
Fièvre		
Non	47	39,2
Oui	51	42,5
Signes de déshydratation		
Soif	35	29,2
Pli cutané	26	21,7
Altération de la conscience	3	2,5

Tableau XVII : Répartition de la population selon les signes non associés à la diarrhée observée.

Signes cliniques associés à la diarrhée (n=120)	Effectif	Pourcentage
Éruption cutanée		
Non	100	83,3
Oui	15	12,5
Otite		
Non	100	83,3
Oui	15	12,5
Conjonctivites		
Non	97	80,8
Oui	16	13,3
Écoulement nasal		
Non	61	50,8
Oui	55	45,8
Toux		
Non	76	63,3
Oui	37	30,8
Dyspnée		
Non	111	92,5
Oui	2	1,7
Convulsions		
Non	114	95
Oui	1	0,8
Frissons		
Non	90	75
Oui	7	5,8
Autres		
Non	118	98,3
Oui	1	0,8

Identification bactérienne

Tableau XVIII : Aspects des selles

Aspects des selles	Effectifs	Pourcentages
Consistance des selles		
Pâteuses ou molles	28	23,3
Liquides	92	76,7
Présence de sang		
Non	118	98,3
Oui	2	1,7
Glaireuses		
Non	66	55
Oui	54	45

Pour les signes associés à la diarrhée et la fièvre était présente chez 42,5% des enfants. Pour les autres signes non associés à la diarrhée signalés les plus fréquents : écoulement nasal et toux chez 50.8% et 30.8% des enfants.

Culture bactérienne

Une coproculture standard a été réalisée sur l'ensemble des échantillons. La recherche des 3 bactéries *Salmonella*, *Shigella* et *E. coli* a été positive pour 38 échantillons (31.7%) (Tableau XIX) avec une forte dominance de *E. coli* (30%). La figure 12 montre la répartition des résultats de la culture en fonction des tranches d'âges.

Tableau XIX : Résultat de la culture bactérienne

Résultats	Fréquences	Pourcentage
Absence de bactéries pathogènes	82	68,3
<i>E. coli</i>	36	30,0
<i>E. coli</i> , <i>Salmonella SPP</i>	1	0,8
<i>Salmonella spp</i>	1	0,8
<i>Shigella spp</i>	0	0
Total	120	100,0

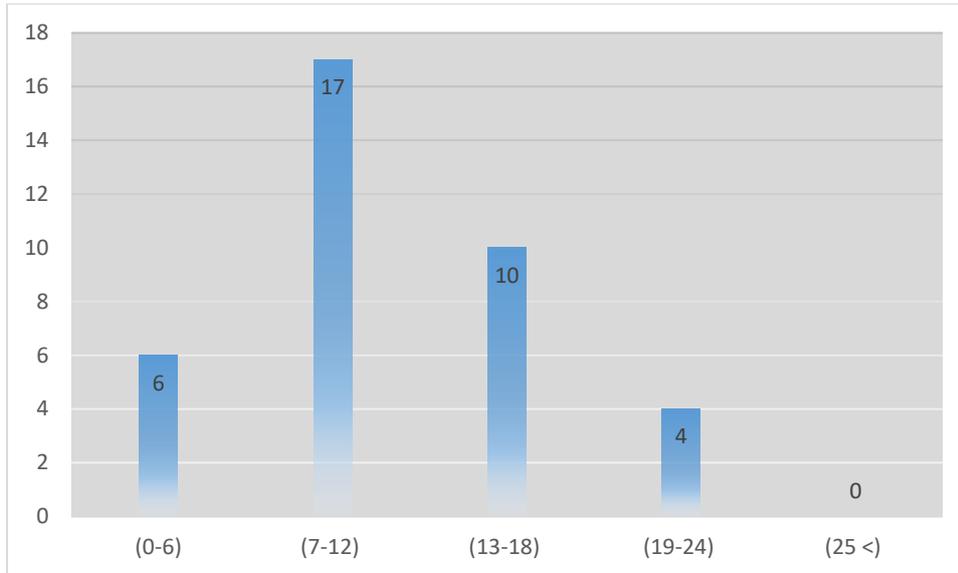


Figure 12 : Répartition des souches isolées à la culture en fonction des tranches d'âges

La plus grande fréquence a été observée avec *Escherichia coli* rencontré 37 fois sur les 38 échantillons positifs à la culture.

Tableau XX : Les serovars d'*E. coli* définis par agglutination

Sérogroupe	Effectifs	Pourcentage
Non groupables	26	70,3
Nonavalent	2	5,4
Trivalent I (O111, O55, O26)	1	2,7
Trivalent II (O86, O119, O127)	6	16,2
Trivalent III (O125, O126, O128)	1	2,7
Trivalent IV (O114, O124, O142)	1	2,7
Total	37	100,0

70,3% des souches identifiées était non groupables.

En fonction des saisons et des sites de prélèvement, les résultats de la culture sont donnés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Résultat de la culture en fonction des saisons de prélèvement, des sites, de l'âge et du mode d'approvisionnement en eau de boisson

	E. coli		Total	P
	Non	Oui		
Saisons (n=120)				
Saison fraiche	14	21	35	0,000
Saison chaude	8	1	9	
Hivernage	61	15	76	
Total	83	37	120	
Sites (n=120)				
ASACOBOUL 1	7	5	12	0,002
ASACOSAB 1	42	8	50	
ASACOSIK 1	15	18	33	
ASACOTOQUA	19	6	25	
Total	83	37	120	
Tranche d'âges (n=120)				
1 an et +	37	18	55	0,414
-1 an	46	19	65	
Total	83	37	120	
Mode d'approvisionnement en eau (n=120)				
Eau minérale	7	2	9	0,573
Borne fontaine	8	3	11	
Robinet à domicile	54	30	84	
Puit	9	2	11	
Total	78	37	115	

La plus forte fréquence d'*E. coli* a été observé à la saison fraiche soit 22/ 37, le CSCom de Sikoroni a donné 18 échantillons positifs à *E. coli*.

E. coli a surtout été présent chez les enfants en période de poussé dentaire, cela se voit sur la figure 14 qui repartie les résultats de la culture selon les signes cliniques observé chez nos enfants.

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

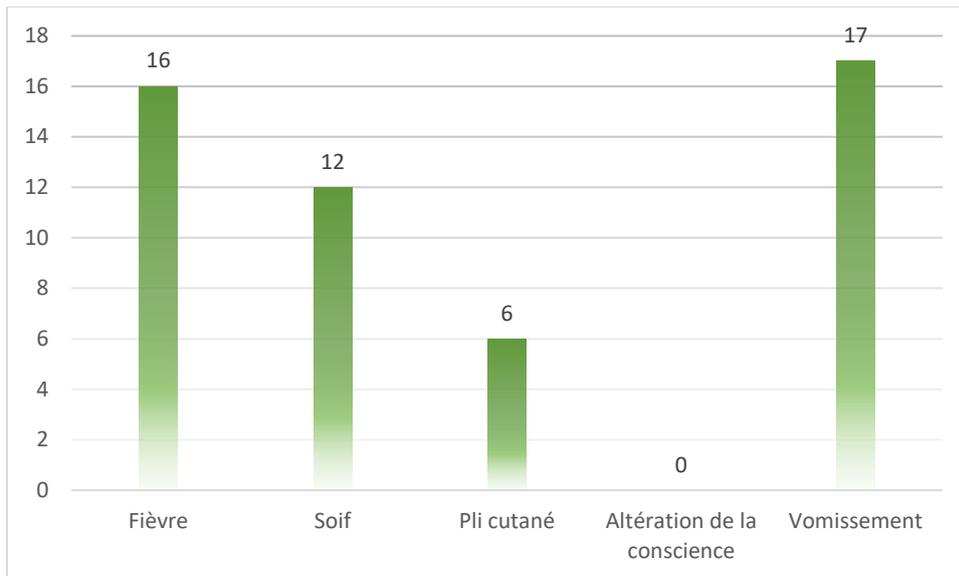


Figure 13 : Répartition des signes cliniques associés à la diarrhée

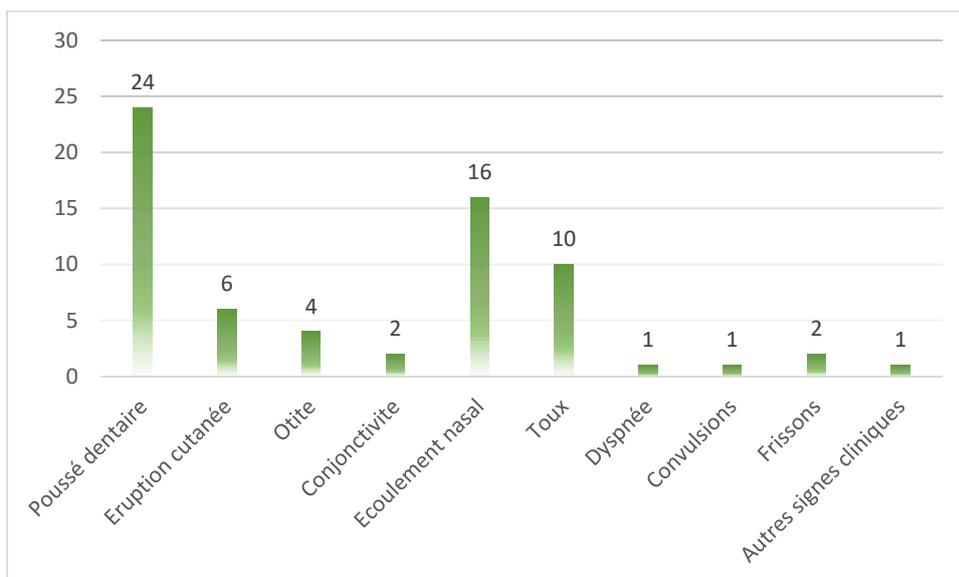


Figure 14 : Répartition des signes cliniques non associés à la diarrhée.

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

Les antibiogrammes par diffusion sur gélose ont montré une forte résistance (Figure 13), de nos souches à un grand nombre d'antibiotiques (Tableau XXII). Nous citons l'amoxicilline et l'association sulfaméthoxazole triméthoprime à 86,8 ; 89,5%.

Tableau XXII : Sensibilité des souches d'*E. coli* aux antimicrobiens (faire la liste par famille d'antibiotiques, refaire la figure aussi en fonction de la nouvelle disposition)

Antibiotiques	Valeurs critiques	Nombres d'isolats	% I	% R	% S
Bêta-lactamines					
Amoxicilline	19 – 19	38	0	86,8	13,2
Cefoxitine	19 – 19	38	0	21,1	78,9
Cefepime	27 – 21	38	18,4	21,1	60,5
Amoxicilline acide clavulanique	19 – 19	38	0	60,5	39,5
Ticarcilline	23 – 23	38	0	89,5	10,5
Imipenem	22 – 16	38	10,5	0	89,5
Ceftazidime	22 – 19	38	18,4	13,2	68,4
Quinolones					
Pefloxacine	24 – 24	38	0	65,8	34,2
Acide nalidixique	19 – 14	38	21,1	52,6	26,3
Aminosides					
Amikacine	16 – 13	38	10,5	18,4	71,1
Tobramycine	17 – 14	38	15,8	21,1	63,1
Gentamicine	17 – 14	38	2,6	28,9	68,5
Autres					
Chloramphenicol	17 – 17	38	0	5,3	94,7
Sulfaméthoxazole triméthoprime	14 – 11	38	0	89,5	10,5
Tetracycline	18 – 15	38	13,2	81,6	5,2

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

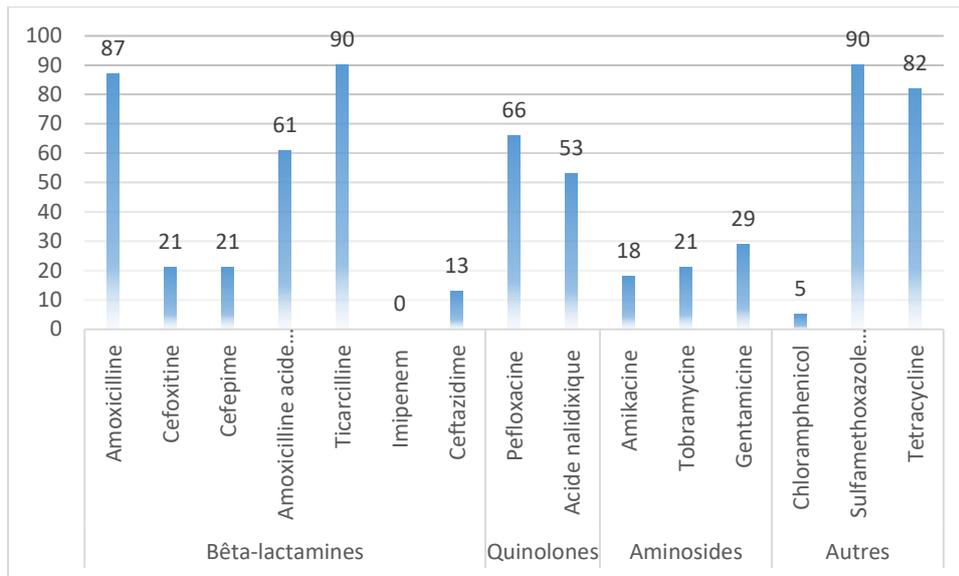


Figure 15 : Pourcentage de résistance des souches de *Escherichia coli* vis-à-vis des antibiotiques testés

Résultats de la PCR

La méthode de PCR classique a été appliquée sur les isolats d'*Escherichia coli* isolés à partir des selles. Des résultats positifs et négatifs ont été obtenus dans la recherche des gènes de virulence et de résistance comme le montre les tableaux XXIII à XXVI.

Résultat de la recherche des gènes de virulence codant les adhésines et les enterotoxines.

Tableau XXIII : Résultats de la recherche des gènes des enterotoxines

Résultats	Gènes des enterotoxines			
	<i>lt</i>	<i>slt1</i>	<i>slt2</i>	<i>Sta</i>
Négatif	36	27	38	22
Positif	2	11	0	16
Total	38	38	38	38

Tableau XXIV : Résultats de la recherche des gènes des adhésines

Résultats	Gènes des adhésines			
	<i>eagg</i>	<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>ipaH</i>
Négatif	34	31	31	32
Positif	4	7	7	6
Total	38	38	38	38

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

Les Résultats de la recherche des gènes codant pour les enterotoxines, *slt* a été détecté dans 11 cas. Et pour les gènes codant pour les adhesines les gènes *eae* et *bfp* ont été détecté chez 7 isolats.

La présence des bandes à 494 pb (Figure 14) témoigne de l'amplification des gènes d'*Escherichia coli* positifs en *eae*.

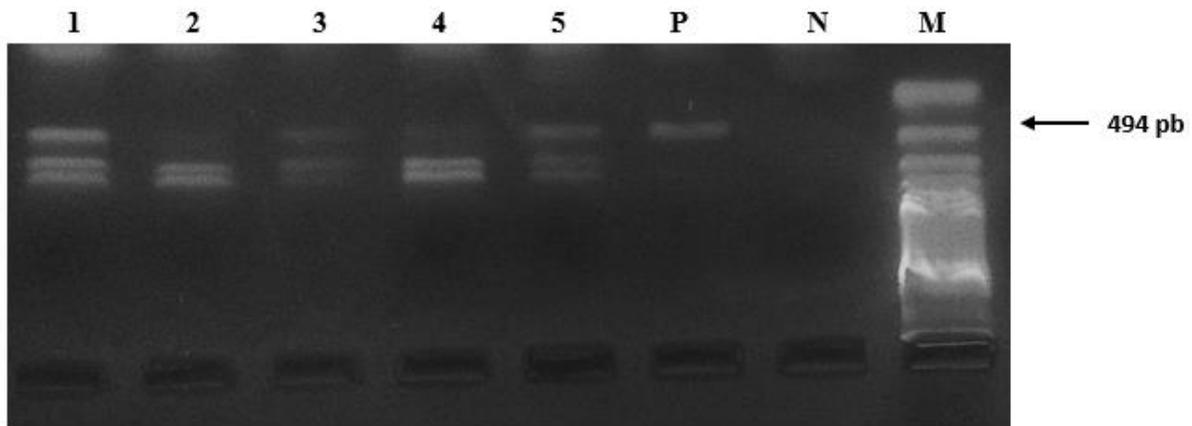


Figure 16 : Résultat d'une PCR *eae* (Source: INRSP)

Légende : **M** : marqueur de taille des fragments d'ADN (100 pb)
N : contrôle négatif
P : contrôle positif pour *eae* (taille attendue : 494 pb)
1 à 5 : amplicons d'*Escherichia coli*

Résultats de la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques

Tableau XXV : Résultats de la recherche des gènes de résistance (intégrons)

Résultats	Intégrons		
	<i>int1</i>	<i>int2</i>	<i>int3</i>
Négatif	24	33	25
Positif	14	5	13
Total	38	38	38

Tableau XXVI : Résultats de la recherche des gènes de résistance (ATB isolement)

Résultats	Gènes de résistance							
	<i>catA</i>	<i>tet</i>	<i>Shv</i>	<i>Oxa</i>	<i>Tem</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
Négatif	33	13	30	38	23	35	34	27
Positif	5	25	8	0	15	3	4	11
Total	38	38	38	38	38	38	38	38

Les résultats de la recherche des intégrons, montrent *int1* détecté chez 14 isolats. La recherche des gènes de résistance spécifiques, montre le gène *tet* chez 25 isolats

Les bandes sur les figures 15 à 18 confirment l'amplification des gènes d'*Escherichia coli* positifs aux gènes de résistance testés.

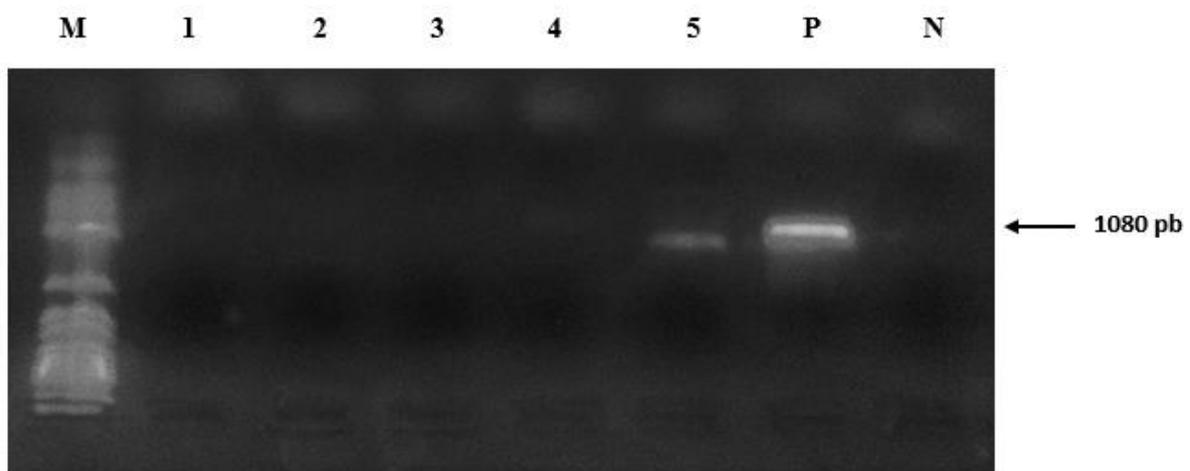


Figure 17 : Résultat d'une PCR tem (Source: INRSP)

Légende : **M** : marqueur de taille des fragments d'ADN (100 pb)
N : contrôle négatif
P : contrôle positif pour tem (taille attendue : 850 pb)
1 à 5 : amplicons d'*Escherichia coli*

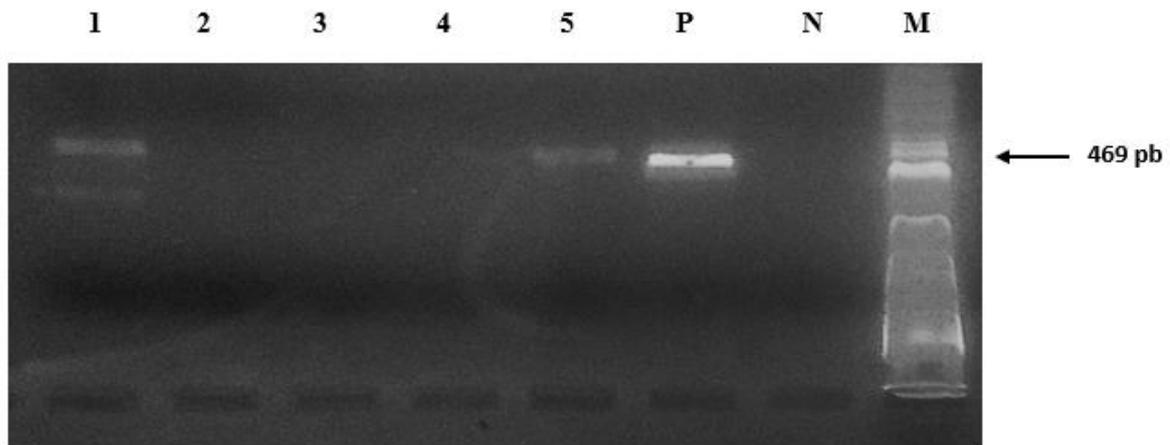


Figure 18 : Résultat d'une PCR *qnrB* (Source: INRSP)

Légende : **M** : marqueur de taille des fragments d'ADN (100 pb)
N : contrôle négatif
P : contrôle positif pour *qnrB* (taille attendue : 469 pb)
1 à 5 : amplicons d'*Escherichia coli*

Une répartition des facteurs de virulence détectés en fonction des signes observés et des pathovars d'*E. coli* est donnée dans le tableau XXV et la figure 19.

Tableau XXVII : Représentation des facteurs de pathogénicité en fonction des pathovars d'*E. coli*.

Pathovars	Gènes virulence associés	Fréquences	Syndrome Clinique
EPEC	<i>Bfp</i>	7	Diarrhée aqueuse, aiguë et persistante
	<i>Eae</i>	7	
EAEC	<i>Sta</i>	16	Diarrhée aqueuse, aiguë et persistante
	<i>Eagg</i>	4	
	<i>slt1</i>	11	
EHEC	<i>slt2</i>	0	Diarrhée aiguë, colite hémorragique, SHU
	<i>Eae</i>	7	
ETEC	<i>Lt</i>	2	Diarrhée cholériforme, diarrhée du voyageur
EIEC	<i>ipaH</i>	6	Dysenterie, diarrhée de l'adulte

Le pathovars EAEC a été le plus retrouvé, 16 de nos isolats ce qui implique, un syndrome de diarrhée aqueuse, aiguë et persistante chez ces enfants.

Tableau XXVIII : Représentation des facteurs de pathogénicité en fonction des signes cliniques

Signes cliniques	Facteurs de virulence						
	<i>sta</i>	<i>ipaH</i>	<i>Eagg</i>	<i>slt1</i>	<i>lt</i>	<i>bfp</i>	<i>eae</i>
Signes associés							
Fièvre	7	1	2	5	2	5	4
Soif	0	1	1	1	1	3	2
Pli cutané	4	0	1	0	1	1	1
Vomissement	10	2	3	6	1	2	2
Signes non associés							
Poussé dentaire	12	4	3	8	0	6	3
Eruption cutanée	1	1	0	3	1	1	1
Otite	2	2	0	1	1	2	0
Conjonctivite	0	0	0	0	0	1	1
Écoulement nasal	5	3	2	5	0	4	5
Toux	8	3	2	7	1	3	1
Dyspnée	0	0	0	0	0	0	0
Convulsions	0	0	0	0	0	0	0
Frissons	0	0	0	0	0	1	0
Autres	0	1	0	0	0	0	0

Les tableaux XXIX à XXXI résument les résultats des croisements des facteurs de virulence et gènes de résistance positifs aux signes cliniques associés à la diarrhée, aux sites de prélèvement et aux tranches d'âges.

Tableau XXIX : Répartition des facteurs de virulence positifs selon les signes associés

	Signes associés			P
	Non	Oui	Total	
Gènes des enterotoxines (n=37)				
lt	0	2	2	0,706
slt1	3	8	11	0,221
sta	3	13	16	0,502
Gènes des adhésines (n=37)				
eae	0	7	7	0,267
bfp	2	5	7	0,302
Eagg	0	4	4	0,487
ipaH	4	2	6	0,003
Intégrons (n=37)				
int1	2	12	14	0,615
int2	1	4	5	0,599
int3	2	11	13	0,672
Gènes de résistance (n=37)				
catA	2	3	5	0,169
tet	4	21	25	0,672
tem	2	13	15	0,556
shv	0	8	8	0,215
qnrA	1	2	3	0,412
qnrB	2	2	4	0,11
qnrS	2	9	11	0,571

Tableau XXX : Répartition des facteurs de virulence positifs selon les sites

	Sites				Total	P
	ASACOBOUL 1	ASACOSAB 1	ASACOSIK 1	ASACOTOQUA		
Gènes des enterotoxines (n=37)						
lt	0	2	0	0	2	0,048
slt1	0	1	7	3	11	0,202
sta	0	3	7	6	16	0,026
Gènes des adhésines (n=37)						
eae	5	1	1	0	7	0
bfp	0	2	5	0	7	0,263
Eagg	0	1	0	3	4	0,015
ipaH	0	3	3	0	6	0,165
Intégrons (n=37)						
int1	1	0	10	3	14	0,044
int2	1	0	3	1	5	0,655
int3	0	2	7	4	13	0,194
Gènes de résistance (n=37)						
catA	0	1	3	1	5	0,81
tet	2	4	15	4	25	0,168
tem	0	0	11	4	15	0,005
shv	0	0	4	4	8	0,03
qnrA	0	3	0	0	3	0,007
qnrB	0	0	4	0	4	0,174
qnrS	0	3	4	4	11	0,143

Tableau XXXI : Répartition des facteurs de virulence positifs selon les tranches d'âges

	Tranche d'âges			P
	1 an et +	-1 an	Total	
Gènes des enterotoxines (n=37)				
lt	2	0	2	0,218
slt1	4	7	11	0,307
sta	7	9	16	0,48
Gènes des adhésines (n=37)				
eae	4	3	7	0,437
bfp	2	5	7	0,249
Eagg	1	3	4	0,344
ipaH	0	6	6	0,014
Intégrons (n=37)				
int1	7	7	14	0,535
int2	3	2	5	0,448
int3	7	6	13	0,407
Gènes de résistance (n=37)				
catA	2	3	5	0,552
tet	11	14	25	0,407
tem	10	5	15	0,055
shv	4	4	8	0,589
qnrA	1	2	3	0,541
qnrB	1	3	4	0,344
qnrS	6	5	11	0,417

IV. Discussion

Limite de l'étude

Nous n'avons pas disposé de sérums monovalents pour le sérotypage des souches de *E. coli*, ce qui nous a empêché d'avoir un typage avec plus de précision et aussi un pourcentage élevé de souches non groupables.

Notre série a porté sur les enfants de 0 à 5 ans, cela en raison de la fréquence des maladies diarrhéiques au sein de cette population et de la pathogénicité des *E. coli* sur cette tranche d'âge.

On admet généralement que ces colibacilles ne sont pathogènes qu'en dessus de l'âge de 2 ans mais c'est surtout chez les nouveaux nés et les prématurés que ces germes se manifestent de la façon la plus sévère.

L'incidence des infections par EHEC est variable selon les classes d'âge. Elle atteint son maximum chez les enfants de moins de 3 ans (72).

Généralement *E. coli* est considéré comme systématiquement pathogène lorsqu'il est isolé chez les enfants de 0-2 ans ; par contre chez ceux de 3 ans et plus la pathogénicité est à démontrer en tenant compte d'autres facteurs (73).

La recherche concomitante de 3 bactéries entériques a permis d'avoir des données au plan moléculaire sur 120 échantillons de selles pour la première fois dans notre pays en plus de celles existantes issues de méthodes traditionnelles de diagnostic (Maïga et al., 1975 ; Kodio et al., 1999 ; Sylla et al., 2005 ; Konaté et al., 2007 ; Dembélé et al., 2008 ; Soumaré et al., 2010) notamment la coproculture standard. Les souches isolées des selles ont été conservées à -80°C. La technique d'extraction d'ADN est maîtrisée.

La technique par choc thermique a été celle que nous avons utilisée, l'extraction chimique donne des extraits plus purifiés mais les résultats au final sont comparables donc son impact est faible à l'amplification.

- **Résultats**
 - **Caractéristiques des patients**

L'étude a permis de faire un point sur le profil clinique et bactériologique de ces 120 patients. Dans notre série, 60% des patients étaient âgés de moins de 12 mois avec une prédominance dans la tranche d'âge entre 7 et 12 mois représentant 46.7%.

Une prédominance masculine a été constatée dans notre étude avec un sex-ratio H/F de 1,72.

Nos chiffres sont très proches de ceux rapportés par Zohra et al., en 2014 lors d'une étude sur les gastro-entérites aiguës du nourrisson en Algérie où ils ont rapporté que 61% des patients étaient âgés de moins de 12 mois avec une prédominance dans la tranche d'âge entre 6 et 12 mois 37.21% des cas et une dominance masculine avec un sexe ratio de 2/1 (74).

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

Soumaré et al., en 2010 ont rapporté une prédominance chez les moins d'un an de 36,2% à Bamako.

Selon notre étude 74,2% des familles disposent de robinet a domicile comme mode d'approvisionnement en eau de boisson.

Bien que 49,2% des fiches n'ont pas été renseigné pour les traitements avant l'arrivée des enfants au CSCom, l'automédication surtout par les antibiotiques 24,2% et d'autres moyens non connus 43.3% ont été signalés par les parents.

Dans cette étude ; l'aspect glairo-sanglant de la diarrhée représente 1.7% des cas, et liquide chez 76,7%.

Les signes de déshydratation soif, pli cutané et altération de la conscience étaient respectivement à 29,2%, 21,7% et 2,5%. Les vomissements étaient présents dans 41,7% des cas ; et la fièvre chez 42,5% des cas.

Dans notre série d'autres signes non associés a la diarrhée ont aussi été signalés dont les plus fréquents : écoulement nasale et toux 50.8% et 30.8% des cas.

○ **Coproculture standard**

A la culture *E. coli* a été le plus isolé 30% des échantillons, *Salmonella* spp a été identifié à deux reprises une fois seule et lors d'une co-infection avec *E. coli*. L'étude a été menée sur les souches d'*E. coli*.

M. SOUMARE et al., avaient aussi rapporté une prédominance des *E. coli* en culture lors de leur étude en 2010 avec environ 87% des cas de gastro-enterites chez les enfants de moins de 5 ans.

Un sérotypage par agglutination nous a permis de grouper les souches identifiées. La technique utilisée permet d'obtenir des groupes de sérotypes, et non des sérotypes monovalents. Nous avons ainsi six souches positives au sérum du trivalent II (16,2%), deux au nonavalent (5.4%) et une seule souche respectivement pour les trivalent I, II et IV soit 2.7%. Parmi les isolats 26/38 ont été non groupables par la technique d'agglutination.

Nos résultats diffèrent de ceux rapportés par A. HAMMOUDI et al., 2009 qui ont eu pour les sérotypes O1, O2, O78, 82% et 18% de souches non typables. Ce constat peut s'expliquer par le fait qu'ils ont procédé à un sérotypage à l'aide de sérums monospécifiques contrairement à notre étude.

Les antibiogrammes par diffusion sur gélose ont montré une faible sensibilité de nos souches à un grand nombre d'antibiotiques.

Le taux élevé de résistance des *E. coli* à l'amoxicilline retrouvée dans ce travail (86,8%), a été notée dans plusieurs études : 59,04% en Alger (75), 73,1% à Dakar (76) et 76% aux Maroc (77). La résistance à l'association amoxicilline + acide clavulanique a été de 60,5%. Ce résultat est proche de celui trouvé dans d'autres travaux : 67,5% à Dakar (76) et 57% au

Maroc (77). Ce taux élevé de résistance à l'association amoxicilline + acide clavulanique pourrait être dû à la forte production de BLSE chez nos souches.

L'existence de souches BLSE dans les infections communautaires est inquiétante, et déjà signalée dans d'autres travaux.

A Bamako, le taux des souches de *E. coli* productrices de BLSE en milieu communautaire était de 12% en 2004 contre 15,4% en 2005 et 19,3% en 2006 (78). Ce qui montre une nette progression.

La résistance à la tétracycline et à la ticarcilline était de 94,8% et 89,5%. Ces résistances ont été rapportés par de nombreuses études 87% en Algérie en 2009 (79), 87% au Sénégal en 2013.

Dans notre étude 89,5% des souches d'*E. coli* ont été résistantes à l'association sulfaméthoxazole triméthoprime (cotrimoxazole). D'autres études ont trouvé des taux élevés de résistance des souches de *E. coli* uropathogènes vis à vis du cotrimoxazole : 67,8% et 97% à Dakar (80)74).

Toutes les souches dans cette étude ont gardé une forte sensibilité au Chloramphénicol 94,7%, l'imipénème 89,5% et au cefoxitine 78,9%. Ces résultats confirment ceux obtenus par Coulibaly en 2010 à Bamako respectivement 100% et 92% (81). La bonne efficacité de l'imipénème sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE a été rapportée dans d'autres études : au Bénin (82), en Tunisie (81), au Mali en 2010 au Sénégal en 2013, mais il faut noter que l'imipénème ne doit pas être utilisée comme antibiotique de premier choix du fait de son coût très élevé et de sa disponibilité (prescription hospitalière).

- **Diagnostic moléculaire**
 - **Gènes de virulence**

Sur les 37 isolats testés, seize possèdent le gène codant pour l'entérotoxine sta 42.1%. Le gène *eae* codant l'attachement et l'effacement aux microvillosités intestinales, a été détecté sept fois 18.4%, ainsi que le gène de plasmide codant le faisceau de formation des pili *bfp*. Onze souches ont été positives à l'amplification de *slt1* 28.9%. Cependant aucune souche n'a été positive à la détection du gène *slt2*. Par ailleurs, le gène *lt* a été porté par seulement deux isolats 5.3%. Les gènes *ipaH* et *Eagg* ont été détecté respectivement chez six (06) et quatre (04) souches.

Nous n'avons pas connaissance d'étude faite au Mali sur la recherche des facteurs de virulence chez des souches de *E. coli*.

- **Gènes de résistance**

Au cours de cette étude nous avons identifié différents supports génétiques de la résistance des souches aux antibiotiques tels que : les gènes de résistance aux bêta-lactamines, aux quinolones et des intégrons.

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

Tous les isolats de la collection ont été examinés par PCR pour la présence des intégrases associées aux intégrons de classe 1, 2 et 3. La PCR a permis d'identifier quatorze isolats portant des intégrons de classe 1 36.8% ; 14/38. L'intégron de classe 2 a été retrouvé dans cinq isolats 31,2% parmi les 38 souches. Enfin, treize souches ayant les intégrons de classe 3 ont été détectés dans les 38 isolats 34.2%.

Il a été décrit que chez les entérobactéries, les intégrons de classe 1 étaient les plus retrouvés, suivis des intégrons de classe 2 (48). Notre étude révèle un nombre proche d'intégron 1 et 3, l'intégron 2 a été peu retrouvé. Les intégrons constituent un système de capture, d'expression et de dissémination de gènes sous forme de cassettes. Ils sont impliqués dans la dissémination de la multi résistance des bactéries aux antibiotiques (81).

Dix-huit (18/37) isolats ont été les cibles de détection des gènes qnr A, B et S. La recherche par PCR a montré que 4 isolats 10.5% contenaient les gènes qnrB. Sur la figure 3, la bande à 469 pb observée pour six produits d'amplification confirme la spécificité des ADN amplifiés par les amorces qnrB-F/qnrB-R. Tandis pour la recherche du gène qnrS, onze souches ont donné des bandes à la taille attendue. qnrA quant à lui a été porté par trois souches.

Dans une étude menée par M. Koita au Mali 88% des souches résistantes aux quinolones portaient le gène QnrS et l'association Qnr-BLSE a été retrouvée chez 67% des souches.

En Côte d'Ivoire la prévalence « Qnr-BLSE » était de 27% pour l'ensemble des entérobactéries et 31% chez *E. coli* (83). Au Maroc, Bouchakour et al. ont retrouvé le gène Qnr chez 18,7% des souches de *E. coli* BLSE (81).

Les gènes de résistance aux bêta-lactamines recherchés ont été shv porté par 8 isolats, tem détecté dans quinze isolats et oxa qui n'était porté par aucune des 38 souches testées par la méthode de la PCR classique.

Sur les 37 isolats testés, 25 soit 65,8% portaient le gène tetA associé à la résistance à la tétracycline.

Le gene catA associé à la résistance aux phenicolés, a été détecté dans cinq isolats sur 27 soit 13.2%.

Au Mali, une étude réalisée par M. Koita a montré que parmi les gènes de résistance aux aminopénicillines recherchés, le gène blaTEM1 a été majoritairement retrouvé 72%, suivi des gènes blaOXA1 52% et blaSHV1 38%.(81)

Parmi les trois classes d'intégrons recherchés toujours par M. Koita, les intégrons de classe 1 (gène *intI 1*) ont été majoritairement retrouvés chez 31% des souches et les intégrons de classe 2 (gène *intI 2*) chez 7%.

En Côte d'Ivoire la prévalence « Qnr-BLSE » était de 27% pour l'ensemble des entérobactéries et 31% chez *E. coli* (83).

Au Maroc, Bouchakour et al. ont retrouvé le gène Qnr chez 18,7% des souches de *E. coli* BLSE (81).

V. Conclusion

Les maladies diarrhéiques constituent un véritable problème de santé publique à l'échelle mondiale et occupe toujours un rang important dans la mortalité à tout âge confondu et le 2ème rang dans la mortalité infantile.

Les causes infectieuses notamment bactériennes restent jusqu'à ce jour les premières causes de gastro-entérite ; *E. coli* est selon beaucoup d'études réalisées dans le monde l'une des causes principales des gastro-entérites chez le nourrisson.

La symptomatologie des GE peut aller de la simple diarrhée aqueuse bénigne à la diarrhée sévère associée aux vomissements et fièvre pouvant conduire rapidement à la déshydratation avec toutes les complications qui s'en suivent à savoir les troubles neurologiques et l'état de choc hypovolémique.

Cette étude confirme la présence de souches pathogènes et multi-résistantes parmi les souches d'*Escherichia coli* isolées dans la majorité des cas de diarrhées chez les enfants de 0 à 5 ans à Bamako.

L'étude moléculaire des supports génétiques a permis de détecter plusieurs facteurs de virulence ainsi que des gènes de résistance et intégrons.

La meilleure compréhension des mécanismes de pathogénicité, et des facteurs de virulence impliqués, est une étape importante pour la mise au point de méthodes de détection rapides et spécifiques. Cela permettrait ainsi de contourner les difficultés liées à la mise en évidence de souches pathogènes parmi la multitude d'*E. coli* commensales présentes dans certains prélèvements.

L'augmentation de la résistance à différents antibiotiques et la présence de gènes plasmidiques nécessitent le renforcement de la surveillance de cette résistance dans notre pays, à travers des bonnes pratiques en matière d'antibiothérapie aussi bien dans la communauté qu'à l'hôpital.

VI. Recommandations

Au vu de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

✚ Aux cliniciens :

La réalisation d'analyses bactériologiques avant tout traitement au antimicrobiens en vue du bon usage des antibiotiques.

✚ A la direction de l'INRSP et aux autorités sanitaires :

L'établissement de meilleurs rapports avec les structures sanitaires, pour faciliter leur implication aux travaux de recherche menés avec leur collaboration.

De renforcer les activités de surveillance et de sensibilisation de la population dans le domaine des maladies entériques et celui du bon usage des antibiotiques.

VII. Références

1. IDEA. Enteric diseases - IDEA - Initiative against Diarrheal and Enteric diseases in Africa and Asia [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 20]. Available from: <http://www.cholera-network.org/enteric-diseases/>
2. REMENTA. Réunion de lancement du Réseau ouest africain pour la recherche sur les maladies entériques à potentiel épidémique. Available from: <https://www.mendeley.com/library/>
3. Diouf S, Sarr M, Sy H, Abdallahi O, noire MF-M d'Afrique, 1990 undefined. Malnutrition et diarrhée chez l'enfant au Cu de Dakar: aspects cliniques, épidmiologiques et biologiques. API DPM [Internet]. [cited 2018 Jan 21]; Available from: https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=Diouf+S%2C+Sarr+M%2C+Sy+H%2C+Abdallahi+O%2C+Fall+M.+Malnutrition+et+diarrhée+chez+l%27enfant+au+Cu+de+Dakar%3A+aspects+cliniques%2C+épidmiologiques+et+biologiques.+Médecine+d%27Afrique+noire.+1990%3B37%282%29%3A29-32.&btnG=
4. Sanou I, Kam K, Tougouma A, ... LS-M d'Afrique, 1999 undefined. Diarrhées aiguës de l'enfant: aspects épidémiologiques, cliniques et évolutifs en milieu hospitalier pédiatrique à Ouagadougou. santetropicale.com [Internet]. [cited 2018 Jan 21]; Available from: <http://www.santetropicale.com/Resume/14604.pdf>
5. institut pasteur. *Escherichia coli* : informations et traitements - Institut Pasteur [Internet]. [cited 2018 Jan 26]. Available from: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/escherichia-coli>
6. Données pour le Mali. [cited 2018 Jan 26]; Available from: https://www.path.org/publications/files/VAD_rotavirus_mali_fs_fr.pdf
7. 4ème RECENSEMENT GENERAL DE LA POPULATION ET DE L'HABITAT DU MALI (RGPH-2009). [cited 2018 Jan 26]; Available from: http://www.odsef.fss.ulaval.ca/sites/odsef.fss.ulaval.ca/files/fonds_gp/cdoc_387_odsef.pdf
8. Samaké S, Moussa S, Souleymane T, Étienne B, Mamadou D, Soumaïla D, et al. RÉPUBLIQUE DU MALI Enquête Démographique et de Santé du Mali 2006. 2007 [cited 2018 Jan 26]; Available from: http://instat-mali.org/contenu/pub/eds4_06_pub.pdf
9. Garnier M, Delamare V, Delamare J, Malville EG. Dictionnaire illustré des termes de médecine. 2009 [cited 2018 Jan 26]; Available from: https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=Garnier+M%2C+Delamare+V%2C+Delamare+J%2C+Delamare+T.+Dictionnaire+illustré+des+Termes+de+Médecine%2C+28ème+Edition.+Paris%2C+France%3A+Editions+Maloine%2C+France%3B+2004.&btnG=
10. Groisman E, Cell HO-, 1996 undefined. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Elsevier [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400819856>

11. Schmidt H, reviews MH-C microbiology, 2004 undefined. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://cmr.asm.org/content/17/1/14.short>
12. Hacker J, Blum-Oehler G, ... IM-M, 1997 undefined. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Wiley Online Libr [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x/full>
13. Vernikos G, Bioinformatics JP-, 2006 undefined. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the Salmonella pathogenicity islands. academic.oup.com [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-abstract/22/18/2196/316809>
14. Skarja M, Remic B, ... IJ-IJ of N, 2004 undefined. Boolean networks with variable number of inputs (K). aip.scitation.org [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.1646923>
15. Neilson K, Ali N, Muralidharan S, ... MM-, 2011 undefined. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. Wiley Online Libr [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201000553/full>
16. Hughes D, Thoelen K, Horr e W, ... NM-P of the 7th, 2009 undefined. LooCI: a loosely-coupled component infrastructure for networked embedded systems. dl.acm.org [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1821787>
17. Duengai K, Sithithaworn P, ... UR-J of clinical, 2008 undefined. Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://jcm.asm.org/content/46/1/366.short>
18. HADJER M, KENZA A. Pathogénicité chez *Escherichia coli*. fac.umc.edu.dz [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2015/190-2015.pdf>
19. Greatorex J, microbiology GT-J of clinical, 1994 undefined. Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://jcm.asm.org/content/32/5/1172.short>
20. Eurosurveillance AA-, 1997 undefined. Surveillance des infections   *E. coli* ent roh morrhagiques (EHEC) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Europe. eurosurveillance.org [Internet]. [cited 2018 Jan 26]; Available from: <http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esm.02.12.00133-fr?crawler=true>
21. Bousseboua H. Éléments de microbiologie. Caampus-club, Alger [Internet]. 2005 [cited 2018 Jan 27]; 2eme  dition. Available from: <https://scholar.googleusercontent.com/scholar.bib?q=info:HyhiCpajl5oJ:scholar.google.com/&output=citation&scisig=AAGBfm0AAAAAWmxzDSBIHDMVpG7bmFQbfsOesKUJZGQT&scisf=4&ct=citation&cd=-1&hl=fr>

22. Girardeau JP, Dalmasso A, Bertin Y, Ducrot C, Bord S, Livrelli V, et al. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2018 Jan 27];43(12):6098–107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16333104>
23. Baranyi J, microbiology TR-I journal of food, 1995 undefined. Mathematics of predictive food microbiology. Elsevier [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816059400121L>
24. Paton A, Srimanote P, ... MW-I and, 2001 undefined. Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are. *Am Soc Microbiol* [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <http://iai.asm.org/content/69/11/6999.short>
25. Allerberger F, Wagner M, ... PS-... bulletin E sur, 2001 undefined. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *europemc.org* [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <http://europemc.org/abstract/med/11891383>
26. O'Brien A, LaVeck G, ... MT-TJ of, 1982 undefined. Production of Shigella dysenteriae Type 1-Like Cytotoxin by *Escherichia coli*. *academic.oup.com* [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/146/6/763/930460>
27. Evans J, Chalmers R, Chart H, ... RS-E journal of, 2000 undefined. Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. *Springer* [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1011072907877>
28. Ogden ID, Hepburn NF, MacRae M, Strachan NJC, Fenlon DR, Rusbridge SM, et al. Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2002 Feb [cited 2018 Jan 27];34(2):100–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765x.2002.01052.x>
29. Sugiyama A, Iwade Y, Akachi S, ... YN-J journal of, 2005 undefined. An outbreak of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in a nursery school in Mie Prefecture. *nih.go.jp* [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <http://www.nih.go.jp/niid/JJID/58/398.pdf>
30. Human *Escherichia coli* O157H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *cambridge.org* [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/human-escherichia-coli-o157ratio-h7-infection-associated-with-the-consumption-of-unpasteurized-goats-milk/BF4AB13B34FC5017995BFF9EEB19F937>
31. Liang J, Dziuban E, Craun G, ... VH-... RS, 2006 undefined. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking—United States, 2003–2004. *JSTOR* [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <http://www.jstor.org/stable/24805746>

32. Jackson S, Goodbrand R, ... RJ-E&, 1998 undefined. *Escherichia coli* O157H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. cambridge.org [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/escherichia-coli-o157ratio-h7-diarrhoea-associated-with-well-water-and-infected-cattle-on-an-ontario-farm/03603A80FC490A9FA612D6E454585EC8>
33. microbiology UD-I journal of medical, 2005 undefined. (Patho-) genomics of *Escherichia coli*. Elsevier [Internet]. [cited 2018 Jan 27]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422105001037>
34. Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. Int J Med Microbiol [Internet]. 2005 Oct [cited 2018 Jan 27];295(6–7):455–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16238019>
35. Hendrickson H. Order and Disorder during *Escherichia coli* Divergence. Casadesús J, editor. PLoS Genet [Internet]. 2009 Jan 23 [cited 2018 Jan 28];5(1):e1000335. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000335>
36. Escobar-Páramo P, ... OC-M biology, 2004 undefined. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. academic.oup.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-abstract/21/6/1085/1050762>
37. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. Casadesús J, editor. PLoS Genet [Internet]. 2009 Jan 23 [cited 2018 Jan 28];5(1):e1000344. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000344>
38. Tenaillon O, Skurnik D, Microbiology BP-... R, 2010 undefined. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. nature.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2298>
39. Vet JM-AM, 2003 undefined. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: I) les adhésines et facteurs de colonisation. facmv.ulg.ac.be [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2003_147_2_04.pdf
40. Guiraud J, Guiraud J. Génétique microbienne: bases théoriques et introduction aux applications pratiques. 1993 [cited 2018 Jan 28]; Available from: https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=GUIRAUD+J.+P.+Génétique+ue+microbienne%2C+Bases+théoriques+et+introduction+aux+applications+pratiques.+Paris+%3A+Technique+et+documentation-Lavoisier%2C+1993+%3Bchap+2+et+3%2C+pages+83-151.++&btnG=
41. Guyer D, Radulovic S, ... FJ-I and, 2002 undefined. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://iai.asm.org/content/70/8/4539.short>
42. Donohue-Rolfe A, immunity GK-I and, 1983 undefined. Shigella dysenteriae 1 cytotoxin: periplasmic protein releasable by polymyxin B and osmotic shock. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from:

<http://iai.asm.org/content/39/1/270.short>

43. Soloaga A, Veiga MP, Garcia-Segura LM, Ostolaza H, Brasseur R, Goni FM. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol* [Internet]. 1999 Feb [cited 2018 Jan 28];31(4):1013–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01225.x>
44. Holland R, Wilson R, Microbiology MH-..., 1999 undefined. Characterization of eae+ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. Elsevier [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113599000139>
45. virulence KB-E coli: mechanisms of, 1997 undefined. *Escherichia coli* in the normal flora of humans and animals. books.google.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: [https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=7vFpeDcjBH0C&oi=fnd&pg=PA85&dq=BETTELHEIM+K.A.+Escherichia+coli+in+the+normal+flora+of+humans+and+animals.+In:++Sussman+M.+\(Ed.\),+Escherichia+coli:+mechanisms+of+virulence,+Cambridge+University+Press:+Cambridge,+1997,+85-110.+&ots=f0Se1Dx62H&sig=DYgwUmxLx9m-uQlXHtLaDtF9twk](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=7vFpeDcjBH0C&oi=fnd&pg=PA85&dq=BETTELHEIM+K.A.+Escherichia+coli+in+the+normal+flora+of+humans+and+animals.+In:++Sussman+M.+(Ed.),+Escherichia+coli:+mechanisms+of+virulence,+Cambridge+University+Press:+Cambridge,+1997,+85-110.+&ots=f0Se1Dx62H&sig=DYgwUmxLx9m-uQlXHtLaDtF9twk)
46. news SG-A, 1996 undefined. Proposed newer nomenclature for SLT (VT) family. ci.nii.ac.jp [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10019217634/>
47. Veilleux S, research JD-V, 2006 undefined. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. vetres.org [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2006/01/v6008/v6008.html>
48. Ploy, M., et al., Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 2005. 20(6): p. 343–352. - Recherche Google [Internet]. [cited 2018 Jan 28]. Available from: <https://www.google.fr/search?hl=fr&ei=2k9tWszpDoeusQGLwY7YDw&q=Ploy%2C+M.%2C+et+al.%2C+Les+int%C3%A9grons+en+tant+que+support+g%C3%A9n%C3%A9tique+de+r%C3%A9sistance+aux+antibiotiques.+Immuno-analyse+%26+Biologie+Sp%C3%A9cialis%C3%A9e%2C+2005.+20%286%29%3A>
49. van Vuuren, M., Résistance aux antibiotiques, notamment en aviculture, in Conference OIE. 2001. p. 123-134. - Recherche Google [Internet]. [cited 2018 Jan 28]. Available from: <https://www.google.fr/search?hl=fr&ei=9VBtWoSJIcKZsgGrm7qQAQ&q=van+Vuuren%2C+M.%2C+R%C3%A9sistance+aux+antibiotiques%2C+notamment+en+aviculture%2C+in+Conference+OIE.+2001.+p.+123-134.+&oq=van+Vuuren%2C+M.%2C+R%C3%A9sistance+aux+antibiotiques%2C+notammen t+>
50. Michael G, Butaye P, Cloeckaert A, Infection SS-M and, 2006 undefined. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in Salmonella: an update. Elsevier [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457906000438>

51. Beceiro A, Tomás M, reviews GB-C microbiology, 2013 undefined. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://cmr.asm.org/content/26/2/185.short>
52. Cambray, G, Guerout, A-M, Mazel D. Integrons. Annu Rev Genet [Internet]. 2010 Dec [cited 2018 Jan 28];44(1):141–66. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-102209-163504>
53. Microbiology DM-NR, 2006 undefined. Integrons: agents of bacterial evolution. nature.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1462>
54. Antunes P, Machado J, ... JS-A agents and, 2005 undefined. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica strains and relation with integrons. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://aac.asm.org/content/49/2/836.short>
55. Hansson K, Sundström L, bacteriology AP-... of, 2002 undefined. IntI2 integron integrase in Tn7. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://jb.asm.org/content/184/6/1712.short>
56. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. Front Microbiol [Internet]. 2012 [cited 2018 Jan 28];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00024/abstract>
57. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, ... JR-A agents, 2004 undefined. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://aac.asm.org/content/48/10/3996.short>
58. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Pascual Á, Cano ME, Martínez-Martínez L, Martínez-Martínez L, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother [Internet]. 2011 [cited 2018 Jan 28];17(2):149–82. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X1170513X>
59. Nde C, microbiology CL-J of applied, 2008 undefined. Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of Salmonella serovars collected at a commercial turkey processing plant. Wiley Online Libr [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03535.x/full>
60. Eliopoulos G, diseases PH-C infectious, 2001 undefined. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. academic.oup.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/32/11/1608/464214>
61. Martínez J, reviews FB-C microbiology, 2002 undefined. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://cmr.asm.org/content/15/4/647.short>
62. Microbiology SA-M of C, Edition 10th, 2011 undefined. Klebsiella, Enterobacter,

- Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. asmscience.org [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816728.chap37>
63. Ackers M, Puhf N, Tauxe R, Jama EM-, 2000 undefined. Laboratory-based surveillance of Salmonella serotype Typhi infections in the United States: antimicrobial resistance on the rise. jamanetwork.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/192732>
 64. Croxen M, Law R, ... RS-C microbiology, 2013 undefined. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Am Soc Microbiol [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://cmr.asm.org/content/26/4/822.short>
 65. Croxen M, Microbiology BF-NR, 2010 undefined. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. nature.com [Internet]. [cited 2018 Mar 9]; Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2265>
 66. King L, Mariani-Kurkdjian P, pediatrie MG-A de, 2013 undefined. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France, 1996–2011. infona.pl [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-8c271557-f6b5-3ee4-8a33-2206fb1fc448>
 67. Espié E, Mariani-Kurkdjian P, Filliol I, ... VV-R francophone, 2008 undefined. Infections humaines à *E. coli* producteurs de Shiga-toxines en France: aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques. Elsevier [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773035X08801013>
 68. *Escherichia coli* 0157:H7 and the Hemolytic Uremic Syndrome: Importance of Early Cultures in Establishing the Etiology. academic.oup.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/162/2/553/2190895>
 69. AFSSA R. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de vérotoxines (STEC). 2003 [cited 2018 Jan 28]; Available from: https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=Agence+française+de+sécurité+sanitaire+des+aliments.+Bilan+des+connaissances+relatives+aux+Escherichia+coli+producteurs+de+Shiga-toxines+%28STEC%29.+Maisons-Alfort+%3A+Afssa+%3B+2003.+220+p.+Disponible+à+%3A+http%3A%2F%2Fwww.anses.fr%2FDocuments%2FMICRa-STEC.pdf&btnG=
 70. Gouali M, Médicale FW-L presse, 2013 undefined. Les *Escherichia coli* entérohémorragiques: des entérobactéries d'actualité. Elsevier [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0755498212006082>
 71. Mariani-Kurkdjian P, Laboratoires SB-RF des, 2016 undefined. Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entérohémorragique. Elsevier [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773035X16303276>
 72. Landouré M. PRISE EN CHARGE DE LA DIARRHÉE AIGUE CHEZ LES ENFANTS DE MOINS DE 5 ANS DANS LE SERVICE DE PÉDIATRIE DU

- CENTRE HOSPITALIER. 2010 [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2010/med/pdf/10M242.pdf>
73. techno-science.net. *Escherichia coli* - Les *E. coli* de gastro-entérites infantiles (GEI) [Internet]. [cited 2018 Feb 13]. Available from: <http://www.techno-science.net/glossaire-definition/Escherichia-coli-page-4.html>
74. Imane H. 2013/2014. 2014;
75. MICROBIOLOGIQUES D. TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE DES INFECTIONS URINAIRES. psychanalyse.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: http://www.psychanalyse.com/pdf/infections_urinaires_ttmt_antibiotiques.pdf
76. Sire J, Nabeth P, ... JP-G-C-TJ of I, 2007 undefined. Antimicrobial resistance in outpatient *Escherichia coli* urinary isolates in Dakar, Senegal. jidc.org [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <http://jidc.org/index.php/journal/article/view/19734603>
77. Bourjilat F., Dersi N. BB et al. (2009). "Profil de résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* uropathogènes communautaires au Maroc." European Journal of Scientific Research 38(1): 57-62. - Recherche Google [Internet]. [cited 2018 Jan 28]. Available from: <https://www.google.fr/search?hl=fr&ei=XXK5tWumxClupsAHgiYSICw&q=Bourjilat+F.%2C+Dersi+N.%2C+Bourchrif+B.+et+al.+%282009%29.+%22Profil+de+résistance+aux+antibiotiques+des+Escherichia+coli+uropathogènes+communautaires+au+Maroc.%22+European+Journal+>
78. Dioman S A. Epidémiologie des entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre élargi au CHU du Point G." Thèse Pharmacie Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Otdonto-Stomatologie de Bamako/Mali. - Recherche Google [Internet]. [cited 2018 Jan 28]. Available from: <https://www.google.fr/search?hl=fr&q=Epidémiologie+des+entérobactéries+productrices+de+bêtalactamases+à+spectre+élargi+au+CHU+du+Point+G.%22+Thèse+Pharmacie+Faculté+de+Médecine,+de+Pharmacie+et+d%27Otdonto-Stom>
79. Universit MH, Ibn A, Mostaganem B. Sérotypes , antibiorésistance et identification de gènes de virulence des *Escherichia coli* pathogènes dans les ... 2016;(March).
80. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Dakar, Senegal. academic.oup.com [Internet]. [cited 2018 Jan 28]; Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-abstract/56/1/236/706749>
81. Ii M, Fondamentale M. *Escherichia coli* uropathogènes communautaires à Bamako. 2013;
82. Ahoyo A, Baba-Moussa L, ... AA-M et maladies, 2007 undefined. Incidence of infections dues to *Escherichia coli* strains producing extended spectrum betalactamase, in the Zou/Collines Hospital Centre (CHDZ/C) in Benin. europepmc.org [Internet]. [cited 2018 Jan 30]; Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/17434702>
83. Guessennd N, Bremont S, ... VG-P, 2008 undefined. Qnr-type quinolone resistance in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in Abidjan, Ivory Coast. europepmc.org [Internet]. [cited 2018 Jan 30]; Available from:

*Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées
chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako*

<http://europepmc.org/abstract/med/18926644>

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

Possédez-vous ? Vélo Oui Non Moto Oui Non Auto Oui Non

Evolution

Durée d'hospitalisation en jours |__|

Guérison Non Oui

Complications Non Oui

Les quelles :

Décès Non Oui cause principale:

Sortie contre avis médical Non Oui

Identification des facteurs de virulence et des gènes de résistance aux antimicrobiens par PCR classique de *E. coli*, *Salmonella* et *Shigella*

SOMMAIRE

- I. OBJET
- II. DOMAINE D'APPLICATION
- III. MATERIEL, EQUIPEMENT ET REACTIFS
- IV. PRECAUTION D'UTILISATION
- V. PCR :
 - 1. PRINCIPE
 - 2. TECHNIQUE
 - 3. METHODE D'EXTRACTION
 - 4. METHODE D'AMPLIFICATION
 - 5. METHODE DE DETECTION
- VI. REFERENCES

REMENTA : RESEAU OUEST-AFRICAIN POUR LA RECHERCHE SUR LES MALADIES ENTERIQUES A POTENTIEL EPIDEMIQUE

I. OBJET

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une amplification d'un fragment d'ADN de petite taille (1 million de fois) par action de la Taq ploymérase, d'amorces spécifiques et de nucléotides dans un thermocycleur.

Le but de ce document est de décrire la technique de PCR pour la détection et la caractérisation des déterminants génétiques de la virulence des bactéries et de leur résistance aux antibiotiques.

II. DOMAINE D'APPLICATION

1. DOMAINE

Biologie moléculaire, diagnostic, caractérisation bactérienne et résistance aux antimicrobiens.

2. UTILISATEURS

Pharmaciens, techniciens de laboratoire biologistes, ingénieurs ou agents travaillant ou admis au labo dans le cadre de la thèse, mémoire ou d'un partenariat.

III. MATERIEL, EQUIPEMENT ET REACTIFS

MATERIELS :

1. COMMUN

- Hotte
- P1000, P200
- Embouts à filtre

2. EXTRACTION

- Mini centrifugeuse
- Tubes eppendorf
- Tubes à hémolyse stériles
- Bain-marie
- Appareil à champ pulse
- Portoir et peigne
- Anse jetables en plastique

SOLUTIONS

- Agarose Seakem (FMC)
- Tampon TBE 10 X (pH 8,3) :
 - Tris base 121,1 g/l
 - Acide borique 61,1 g/l
 - EDTA dissodique 9,3 g/l
- Bromure d'éthidium (BET) : solution stock aqueuse à 10 mg/ml (Gibco BRL)

ATTENTION : le bromure d'éthidium est mutagène. Porter des gants pour le manipuler.

REACTIFS

- Qiang DNA Mini Kit Cat. 51304 Qiagen

SOUCHES BACTERIENNES

- Souches témoins
- Souches à tester
- Echantillons tests
- 6 souches de Salmonelles (PFGE)

IV. PRECAUTION D'UTILISATION

- Respecter l'utilisation des équipements de protection individuelle (EPI) : gants, blouses, ...
- Respectez les précautions universelles : tous les prélèvements doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés en suivant les précautions recommandées (NCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue ; Approved Guideline - December 1997).
- Pour plus d'informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS

V. PCR

1. PRINCIPE

Le DNA double brin est initialement dénaturé avec une température élevée. Ensuite deux amorces (sens et anti sens) spécifiques s'hybrident à l'acide nucléique cible en présence d'un excès de désoxynucléotides et une Taq polymérase (stable à haute température) et synthétise le brin complémentaire. Il en résulte n cycles qui permettent d'obtenir 2n copie d'ADN.

2. TECHNIQUE

Amplification des fragments d'ADN par PCR dans un thermocycleur (9700 thermal cycle Applied Biosystems).

3. METHODE D'EXTRACTION

➤ Extraction de l'ADN total : Par choc thermique

1. Effectuer un isolement sur gélose tryptocaséine soja ou sur MH.
2. Dans un tube eppendorf, ajouter 200µl d'eau distillée stérile.
3. Pour chaque échantillon ; prélever 3 à 4 colonies et bien les mélanger dans le tube
4. Faire bouillir les tubes pendant 10 minutes à 100°C dans un bain-marie.
5. Centrifuger à 12000tours/mn 10 minutes.
6. Récupérer dans un autre tube juste après la centrifugation 150µl du surnageant sans toucher le culot.

NB : Si l'extrait n'est pas amplifié immédiatement, garder les tubes à -20°C jusqu'à utilisation.

➤ Extraction d'ADN génomique : Par Qiamp DNA Mini Kit Cat. 51304 Qiagen

1. Racler les colonies 3 à 4 et les diluer dans 180µl de tampon ATL, vortexer
2. Ajouter 20 µl de protéinase K, vortexer,
3. Incuber à 56°C, 1 heure
4. Centrifuger brièvement (15 secondes) à la fin de l'incubation
5. Ajouter 200µl de tampon AL, vortexer, incuber à 70°C, 10 minutes
6. Centrifuger brièvement (quelques secondes)
7. Ajouter 200µl d'éthanol absolu (96-100°), vortexer
8. Centrifuger brièvement (quelques secondes)
9. Déposer le mélange (600µl, y compris le précipité) dans la colonne Qiagen, centrifuger 6000g, 1 minute
10. Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube de collection.
11. Ouvrir la colonne doucement et ajouter 500µl de tampon AW1 additionné d'éthanol, refermer la colonne et centrifuger à 6000g, 1 minute.
12. Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube de collection.
13. Ouvrir la colonne et ajouter 500µl de tampon AW2 additionné d'éthanol, refermer la colonne et centrifuger à 20000g, 3 minutes.

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

14. Ajouter 200 µl de tampon AE, incuber à température ambiante 1 minute, centrifuger à 6000g, 1 minute
15. Mettre la colonne dans un tube eppendorf de 1,5ml
16. Jeter la colonne et conserver l'ADN à -20°C ; faire un dépôt sur gel.

4. METHODE D'AMPLIFICATION

Recherche des gènes des facteurs de virulence

<i>E. coli</i>	Gène recherché	Taille de l'amplicon	Température d'hybridation	Concentration Gel agarose	Témoin positif
Entéro-pathogènes EPEC	<i>bfp A</i>	324 bp	57°C	2%	E2348-69
	<i>Eae A</i>	494 bp	65°C	2%	E2348-69
Entéro-invasifs EIEC	<i>ipaH</i>	424 bp	53°C	2%	M90T
Entéro-agrégatifs EAaggEC	<i>Agg</i>	630 bp	53°C	2%	17.2
Entéro-hémorragiques EHEC	<i>SLT1</i>	130 bp	56°C	3%	EDL 933
	<i>SLT2</i>	346 bp	56°C	2%	EDL 933
Entéro-toxinogènes ETEC	<i>LT</i>	707 bp	56°C	2%	EDL 1493

température	Nombre de gène	Gènes recherchés	Témoins
43°C	1	<i>Sta</i>	EDL1493
53°C	2	<i>ipaH, Eagg</i>	M90T;17.2
56°C	3	<i>SLT1, SLT2, LT</i>	EDL933
57°C	1	<i>Bfp</i>	E2348-69
65°C	1	<i>Eae</i>	E2348-69

Recherche des gènes de résistance

Gène	Température d'hybridation	Témoin positif	Concentration en agarose	Taille de l'amplicon (pb)
<i>int1</i>	57°C	S.concord 07-670 = R3	2%	580
<i>int2</i>	62°C	S.dysenteriae CAR10 = R7	2%	806
<i>int3</i>	62°C		2%	1200
<i>OXA1</i>	55°C	S.typhimurium 02-8213 = R5	2%	890
<i>SHV</i>	55°C	S.concord 07-670 = R3	2%	800
<i>TEM</i>	55°C	S.concord 07-670 = R3	2%	850
<i>CatA1</i>	57°C	S.dysenteriae CAR10 = R7	2%	450
<i>Tet</i>	55°C	S.dysenteriae CAR10 = R7	2%	956

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

<i>QnrA</i>	55°C		2%	657
<i>QnrB</i>	55°C	S.havana 07-319 = R6	2%	469
<i>QnrS</i>	55°C	E.cloacae AME = R4	2%	417

Préparation du mélange réactionnel

Réactifs (concentration)	Volume par échantillon (µl)	Nombre de réaction + témoins	Volume final (µl)
Tampon 10X	2,5		
Mgcl2 (25mM)	2		
Amorces (10mM) P1	1,5		
	1,5		
Amorces (10mM) P2	1,5		
	1,5		
Amorces (10mM) P3	1,5		
	1,5		
Amorces (10mM) P4	1,5		
	1,5		
dNTP (10mM)	0,5		
Taq polymérase (5U/µl)	0,25		
Eau PPI QSP	5,25		
Répartir sous:	22,5		
Ajouter ADN	2,5		

- Numéroter les tubes
- Pour chaque échantillon le nombre à calculer :
nbre d'échantillons + T(-) + T(+) + 1volume supplémentaire

NB : travailler sous la glace ; Repartir 22,5µl du mix dans chaque, ajouter 2,5µl de l'extrait d'ADN.

Mettre dans le thermocycleur avec le programme indiqué :

PCR *int1*

Séquence des amorces :

Int1-F : 5' ACA TGT GAT GGC GAC GCA CGA 3'

Int1-R : 5' ATT TCT GTC CTG GCT GGC GA 3'

Programme d'amplification

94°C	5min	} 35 cycles
94°C	30sec	
57°C.....	1min	

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

72°c 1min
72°c 10min
4°c ∞

PCR int2

Séquence des amorces :

Int2-F : 5' GTA GCA AAC GAC TGA CGA AAT G 3'

Int2-R : 5' CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T 3'

Programme d'amplification

94°c 5min
94°c 30sec
62°c 1min
72°c 1min
72°c 10min
4°c ∞

} 35 cycles

PCR blaOXA

Séquence des amorces :

blaOXA1-F : ATGAAAAACACAATACATATC

blaOXA1-R : AATTTAGTGTGTTTAGAATGG

Programme d'amplification

94°c 5min
94°c 30sec
47°c 30sec
72°c 1min
72°c 10min
4°c ∞

} 35 cycles

PCR blaSHV

Séquence des amorces :

blaSHV-F : TTATCTCCCTGTTAGCCACC

blaSHV-R : GATTTGCTGATTCGCTCGG

Programme d'amplification

94°c 5min
94°c 30sec
47°c 30sec
72°c 1min

} 35 cycles

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

72°C 10min

4°C ∞

PCR blaTEM

Séquence des amorces :

blaTEM-F : ATAAAATTCTTGAAGACGAAA

blaTEM-R : GACAGTTACCAATGCTTAATCA

Programme d'amplification

94°C 5min

94°C 30sec

47°C 30sec

72°C 1min

72°C 10min

4°C ∞

} 35 cycles

PCR CatA

Séquence des amorces :

CatA1-F : CGCCTGATGAATGCTCCG

CatA1-R : CCTGCCACTCATCGCAGTAC

Programme d'amplification

94°C 5min

94°C 30sec

59°C 30sec

72°C 1min

72°C 10min

4°C ∞

} 35 cycles

PCR TetA

Séquence des amorces :

TetA-F : GTAGTAATTCTGAGCACTGTCCGC

TetA-R : CTGCCTGGACAACATTGCTT

Programme d'amplification

94°C 5min

94°C 30sec

55°C 30sec

72°C 1min

72°C 10min

4°C ∞

} 35 cycles

PCR QnrA

Séquence des amorces :

QnrA-F : TCAGCACAAAGAGGATTTCTC

QnrA-R : GGCAGCACTATTACTCCCA

Programme d'amplification

94°C 5min
94°C 30sec
51.5°C 30sec } 35 cycles
72°C 1min
72°C 10min
4°C ∞

PCR QnrB

Séquence des amorces :

QnrB-F : GATCGTGAAAGCCAGAAAGG

QnrB-R : ACGATGCCTGGTAGTTGTCC

Programme d'amplification

94°C 5min
94°C 30sec
53°C 30sec } 35 cycles
72°C 1min
72°C 10min
4°C ∞

PCR QnrS

Séquence des amorces :

QnrS-F : ACGACATTCGTCAACTGCAA

QnrS-R : TAAATTGGCACCCCTGTAGGC

Programme d'amplification

94°C 5min
94°C 30sec
53°C 30sec } 35 cycles
72°C 1min
72°C 10min
4°C ∞

Peuvent être amplifié ensemble :

- Gènes blaSHV et blaTEM
- Gènes QnrB et QnrS

Révélation

Electrophorèse en champ pulse

Principe

Ce type d'électrophorèse a été développé par Schwartz et Cantor en 1984 afin de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0,4% les gels sont impossibles à manipuler). La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est d'environ 18 microns. La vitesse de migration des molécules d'ADN dont la taille est supérieure à 20 kb n'est plus affectée par l'effet de filtration, elle est constante quelle que soit la taille de la molécule. Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel. Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille. L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1kb à une dizaine de méga bases. Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique de champ pulsé ont été développées : OFAGE, CHEF, FIGE, TAFE, etc. les conditions d'électrophorèse dépendent de la zone de taille à résoudre. Le marqueur de taille que nous utilisons le plus fréquemment, servant de référence pour la taille des fragments, est l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*.

Référence :

- Schwartz, D.C. and C.R. Cantor (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. **37**: 67
- Chu, G., D. Vollrath and R.W. Davis (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science*. **234**:1582.

PREPARATION DES INSERTS

1. Cultiver les échantillons une nuit en boîte de pétri

Préparer : 1 bac à glace

Allumer le bain-marie et régler la température à 50-55°C

2. Faire fondre l'agarose clean cut à 1,2% en utilisant un four à micro-ondes (environ 20 secondes), et le maintenir à 50-55°C (bain-marie) pour couler les inserts.
3. Préparer les suspensions bactériennes : 1 à 2 ml de cell suspension buffer, ajouter quelques colonies microbiennes à l'aide d'un écouvillon bien mélanger et mesurer la DO elle doit être comprise entre 5-7 Mac Farland.

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

4. Préparer des tubes eppendorf stériles, ajouter 500 µl de chaque échantillon dans chaque tube. Mettre les échantillons à 50°C.
5. Pour cette étape, traiter chaque tube l'un après l'autre. Ajouter 500µl d'agarose clean cut à 1,2% et mélanger (au vortex ou à la pipette). Pipeter immédiatement 200µl - 100µl du mélange et remplir le moule à insert (éviter les bulles) laisser solidifier pendant 10 à 15min à 4°C.
6. Préparer la solution de protéinase K à 2mg/ml dans le tampon de protéinase K. prévoir 2,5ml de solution par insert en tube Falcon de 50ml.
7. Démouler les inserts et les plonger dans les solutions de protéinase K.
8. Mélanger et incubé les inserts une nuit à 55°C au bain marie.
9. Plonger les tubes dans de la glace 15-30min.
10. Eliminer la solution de protéinase K et laver les inserts avec 10ml de TE 1X pendant 45min à température ambiante sous agitation douce à 50°C.
11. Répéter cette étape de lavage 3 fois (les inserts peuvent être conservés 3 à 6 mois à 4°C dans 10ml de TE 1X).

DIGESTION DES INSERTS

1. Pour chaque échantillon, transférer in insert dans un tube de 2ml
2. Laver les inserts et l'insert de contrôle avec 1ml de wash TE 0,1X sous agitation douce à température ambiante 3 fois 15min.
3. Préparer le tampon de digestion : Tampon H (10X) : 20µl
H₂O maximum : 180µ

- Pré-incubation :

Ajouter 200µl de tampon de digestion dans chaque tube

Incuber 30 à 60min à température ambiante

- Digestion :

Pour chaque insert, ajouter :

20µl Tampon H (10X)

2µl BSA

5µl d'enzyme de restriction (XbaI)

173µl H₂O maxima

Bien mélanger et incubé 16-20h à 37°C

- Arrêter la digestion en ajoutant 10µl d'EDTA 0,5X, incubé 30min à 37°C.
- Eliminer le tampon et ajouter 1ml de TE 1X les inserts peuvent être conservés 2 à 4 semaines à 4°C.

PREPARATION DU GEL

1. Préparer 100ml de tampon TBE 1X.
2. Peser la quantité d'agarose correspondant à la concentration désirée. (1g)
3. Dans un erlenmeyer de capacité suffisante (2-3 fois le volume de gel), mettre le tampon et ajouter la poudre d'agarose.
4. Dissoudre l'agarose dans un four à micro-ondes jusqu'à disparition complète des particules d'agarose : la solution doit devenir limpide.
5. Refroidir l'erlenmeyer au bain marie à 50°C.

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

6. Découper les inserts au quart ainsi que les marqueurs de taille et les poser sur les dents du peigne, les fixer avec de l'agarose.
7. Monter le support du gel sans oublier la plaque noire puis positionner le peigne.
8. Verser le gel d'agarose dans le moule et laisser solidifier (au moins 30min).

PROTOCOLE DE L'ELECTROPHORESE

1. Enlever délicatement le peigne et les barrettes.
2. Mettre du tampon TBE 0,25 X dans la cuve à champ pulsé et le refroidir à la température souhaitée (14°C) pour la migration. Il faut avoir mis en marche le système de refroidissement de la cuve quelque heure auparavant.
3. Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse.
4. Programmer la migration. Ce programme dépend de la taille des fragments à séparer. Dans le cas de l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*, les conditions suivantes permettent de résoudre tous les chromosomes :

Temps de pulse initial 1 s

Temps de pulse final 17 s

Temps de migration 4-20h

Volt/cm 6

Ange 120°

Température 14°C

5. Arrêter l'appareil à champ pulsé, sortir le gel et le déposer dans un bac contenant une solution de BET à une concentration finale de 0,01 µg/ml. Colorer le gel pendant 30min.
6. Faire la contre coloration dans l'eau (500ml) 45min.

NB : porter des gants pour manipuler le matériel contenant du bromure d'éthidium et porter un masque et des lunettes de protection spéciales devant l'appareil à UV.

PREPARATION DE GELOSE MUELLER-HINTON (MH)

C'est un milieu utilisé pour la recherche de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

- Amidon, agar, hydrolysate de caséine
- Verser 35g de poudre dans 1litre d'eau distillée. Porter à l'ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave (121°C, 15min).

PREPARATION DES EXTRAITS DE DNA

QIAamp DNA Mini Kit Ref cat 51304 Qiagen

Eppendorf 2ml

Appareil de chauffage 100-150°C

Centrifugeuse 6000-12000rpm

POUR LES AMPLIFICATIONS GENETIQUES (PCR)

Cones : jaune, bleu, blanc

Pipettes : 1-10µl

Pipettes : 10-20µl

Pipettes : 20-100µl

Pipettes : 100-1000µl

Tubes Eppendorf : 1,5ml

Tubes eppendorf : 0,2ml

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

Thermocycleur 2720

Appareil à glace

Balance

Hotte

Four micro-ondes

Cuve de migration

Générateur électrique

Camera photo gel

Lunettes de protection

PREPARATION DES NUCLEOTIDES

500 µl à 20mM à partir de solution à 100mM

- dATP.....100 µl
- dCTP.....100 µl
- dGTP.....100 µl
- dTTP.....100 µl

Eau distillée stérile.....100ml

Conserver à -20°C

PREPARATION DE TAMPON DE LAVAGE TE 1X

Trizma base : 1,2g

Titriplex III : 0,37g

Eau distillé (qsp) : 1000ml

Dissoudre, ajouter le pH avant de compléter à 11

Autoclaver 20min à 110°C

Se conserve à la température du laboratoire. (Peut se préparer 10 fois concentré)

PREPARATION DE TAMPON DE MIGRATION TBE 10X

- Tris base.....108 g
- EDTA..... 9,3 g
- Acide borique..... 55g
- Eau distillée.....1000ml

Dissoudre, ajouter à pH 8

Autoclaver 20min à 110°C et conserver à la température du laboratoire

PREPARATION DE TAMPON DE MIGRATION TAE 50X

- Tris base.....242g
- Acide acétique glacial..... 57,1ml
- EDTA 0,5M, pH 8100ml
- Eau distillée qsp.....1000ml

Dissoudre, ajouter à pH 8

Autoclaver 20min à 110°C et conserver à la température du laboratoire

PREPARATION DE GEL A 1%

Peser 1g d'agarose

Ajouter 100ml de tampon de migration

Dissoudre au four à micro-ondes 1min

Étude des facteurs de pathogénicité et des gènes de résistance des souches d'Escherichia coli isolées chez les enfants de 0 à 59 mois dans quatre CSComs du district de Bamako

<i>E. coli</i>	Gène recherché	Concentration agarose	Gel
Entéro-pathogènes EPEC	<i>bfp A</i>	2%	
	<i>Eae A</i>	2%	
Entéro-invasifs EIEC	<i>ipaH</i>	2%	
Entéro-agrégatifs EAggEC	<i>Agg</i>	2%	
Entéro-hémorragiques EHEC	<i>SLTI</i>	3%	
	<i>SLTI</i>	2%	
Entéro-toxinogènes ETEC	<i>LT</i>	2%	

Gène	Concentration en agarose
<i>int1</i>	2%
<i>int2</i>	2%
<i>int3</i>	2%
<i>OXA1</i>	2%
<i>SHV</i>	2%
<i>TEM</i>	2%
<i>CatA1</i>	2%
<i>Tet</i>	2%
<i>QnrA</i>	2%
<i>QnrB</i>	2%
<i>QnrS</i>	2%

PREPARATION DE SOLUTION DE BLEU POUR DEPOT

- Glycerol.....5ml
- Tampon TEK.....5ml
- Bleu de bromophénol.....7mg

Dissoudre, aliquoter et conserver à +4°C