

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But-Une Foi

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



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016-2017

N° _____/

**IMPACT DU SON DE RIZ SUR LA CROISSANCE ET LA
PREVENTION DE LA DIARRHEE CHEZ LES ENFANTS EN
SEVRAGE A DIORO : CAS DE 50 ENFANTS**

THESE

**Présentée et soutenue publiquement le jeudi 29 juin 2017 devant la Faculté de
Pharmacie pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE (DIPLOME D'ETAT)**

Par

M. Seydou DOUYON

JURY

Président du jury : Professeur Ababacar I MAIGA

**Membres : Professeur Ibrahim MAIGA
Professeur Akory Ag IKNANE**

Co-directeur de thèse : Docteur Lassina DOUMBIA

Directeur de thèse : Professeur Ousmane KOITA

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016-2017

ADMINISTRATION

DOYEN : M. BOUBACAR TRAORE - PROFESSEUR

VICE-DOYEN : M. ABABACAR I MAIGA- PROFESSEUR

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. SEYDOU COULIBALY – ADMINISTRATEUR CIVIL

AGENT COMPTABLE : M. FAMALE DIONSAN – CONTROLEUR DES FINANCES

LES PROFESSEURS HONORAIRES

M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Boulkassoum	HAIDARA	Législation
M. Boubacar	Sidiki CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Amadou	DIALLO	Biologie Animale
M. Daouda	DIALLO	Chimie générale & minérale
M. Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
M. Bréhima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
M. Alou A	KEITA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Amagna	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Bakary M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biol/parasitologie Chef DER
M. Alassane	DICKO	Santé publique
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie
M. Mounirou	BABY	Hématologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Ousmane	KOITA	Parasitologie-Moléculaire
M. Abdoulaye	DJIMDE	Microbiologie-Immunologie
M. Abdoulaye	TOURE	Entomologie Moléculaire

M. Akory Ag	IKNANE	Santé publique/Nutrition
M. Ousmane	TOURE	Santé publique

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

Mme Fanta	SANGHO	Santé Publique
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Epidémiologie
M. Kassoum	KAYENTAO	Epidémiologie
M. Issiaka	SAGARA	Epidémiologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seidina Aboubacar	DIAKITE	Immunologie
M. Klétigui Casmir	DEMBELE	Biochimie clinique
M. Yaya	GOITA	Biochimie clinique
M. Oumar	GUINDO	Biochimie
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie-Virologie
M. Falaye	KEITA	Epidémiologie
Mme Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
Mme N'Deye Lallah Nina	MARIKO	Nutrition
M. Yacouba	MAIGA	Bio statistique
Mme Merepin dite Agnes	GUINDO	Immunologie
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie/ Mycologie

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT**1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

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

2. MAITRE DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

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

3. MAITRE ASSISTANT/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie
------------	--------	-------------

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie analytique
M. Madani	MARIKO	Chimie analytique
M. Blaise	DACKOUO	Chimie analytique

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

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

2. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière

3. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

M. Bacary Moussa	CISSE	Galénique
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutique
M. Antoine	DARA	Sciences pharmaceutique
M. Souleymane	DAMA	Sciences pharmaceutique

DER DES SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Mahamadou	TRAORE	Génétique
M. Cheick	TRAORE	Biologie

2. MAITRE DE CONFERENCES MAITRE DE RECHERCHE

M. Mouctar	DIALLO	Biologie/Parasitologie/
M. Lassana	DOUMBIA	Chimie minérale

3. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

M. Moussa	KONE	Chimie organique
-----------	------	------------------

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Boubacar	ZIBEIROU	Physique
M. Mohamed Lamine	DIARRA	Botanique
M. Amidou	DOUCOURE	Chimie Organique
M. Fana	TANGARA	Mathématique
M. Abdel Kader	TRAORE	Sémiologie-médicale
M. Seydou	DOUMBIA	Epidémiologie
M. Moussa I.	DIARRA	Biophysique
M. Massambou	SACKO	SCMP-SIMR
Mme Fatoumata	SOKONA	Santé environnement
M. Abdouramane	COULIBALY	Anthropologie

Dédicaces

Au nom d'ALLAH le Miséricordieux, le très Miséricordieux.

« Gloire à toi ! Nous n'avons de savoir que ce que tu nous as appris. Certes c'est toi l'Omniscient, le sage » Sourate 2, Verset 32 (le Noble Coran)

Louange et gloire à Dieu le Tout Puissant qui m'a permis de mener à bien ce travail. Et que la grâce, le salut, le pardon et les bénédictions d'Allah soient accordés au meilleur de ses créatures, notre prophète et sauveur Mohamed ibn Abdoullah ibn Abdelmoutalib. Ainsi qu'aux membres de sa famille et tous ses compagnons et également à ceux qui les suivent jusqu'au jour dernier.

Je dédie ce travail :

A mes parents : Bamoye et Dogoélou DOUYON

Vous m'avez mis au monde, éduqué et entretenu. Ainsi j'ai appris de vous l'honneur, la dignité, la modestie, l'humilité, la générosité, surtout le respect de soi-même et l'amour du prochain ; qualités dont j'ai bénéficié tout au long de mes études.

En m'inclinant devant vous en signe de reconnaissance, de dévouement et d'entière soumission ; je vous présente mes excuses pour tout le mal lié à mon âge et à mon orgueil et demande vos bénédictions qui ne m'ont d'ailleurs jamais manqué.

Que ce modeste travail, fruit de votre engagement, me rende digne de vous et que **DIEU LE TOUT PUISSANT** vous donne joie et encore longue vie.

A mes mères : Mariam DOUYON et Mariam PERGOUROU

Vous m'avez prouvé que je suis votre fils par vos conseils, vos soutiens moraux et matériels et surtout par la qualité de vos enseignements.

A ma femme : Elisabeth DOUYON

Le mariage est basé sur le soutien mutuel des uns des autres. Si j'ai pu faire ce travail c'est parce que tu as été là pour moi ; me soutenir. Ta patience est irréprochable. Je prie Dieu pour que cette patience perdure et que ton soutien soit toujours effectif. Longue vie à toi.

Mes frères et sœurs :

Le lien de sang est sacré, qu'il dure autant que notre vie. Trouvez ici l'expression de mes sentiments dévoués.

A mon tuteur : Remi DOUYON et toute sa famille

Pour avoir accepté de m'offrir vos soutiens à des moments opportuns trouvez ici l'expression de ma profonde affection.

A mon grand frère et ami : Feu Idrissa DOUYON

Je reconnais que vous avez beaucoup fait pour moi de façon inqualifiable. Je ne pourrai jamais vous récompenser pour ce que vous avez fait pour moi. J'aurai aimé que vous viviez ce moment qui importe pour tout parent, DIEU en a décidé autrement. Je LE prie de vous accueillir dans son paradis.

A tous mes amis : De Tendji Ireli ; du primaire ; du secondaire de la faculté de médecine et d'odontostomatologie ; de la faculté de pharmacie ; du LBMA ; de Doro pour l'enseignement que j'ai eu de votre part.

Remerciements

Mes remerciements s'adressent :

Au TOUT PUISSANT, LE TOUT MISERICORDIEUX, LE TRES MISERICORDIEUX

A mon père

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

J'espère de tout mon cœur que de là où tu te trouves, tu seras fier de moi comme je l'ai toujours été de toi.

A ma mère

Que des souffrances et des souffrances endurées pour nous, tes enfants. Il est aussi clair et évident que jusqu'à la fin des temps, je ne pourrai jamais vous récompenser pour ce que vous avez fait pour moi.

Tu as fait preuve d'amour maternel et irréprochable à mes frères et moi.

Que Le TRES HAUT vous récompense pour votre service sans prix.

A ma tante

Vous avez été plus qu'une tante pour moi je vous ai toujours senti à mes côtés aux moments où j'avais le plus besoin de soutien.

Vous avez été toujours là pour me conseiller, me consoler, me guider et m'aider en toute circonstance.

A mon oncle pour ton soutien inconditionnel et l'amour sans distinction. Cher oncle grâce aux rigueurs dans le travail bien fait que tu nous as toujours enseigné j'ai eu cette confiance en moi de devenir un pharmacien.

A mes frères, sœurs, cousines et cousins : Soumaila, Abdoulaye, Laya, Issa, Fatouma, Malick, Théophile etc.

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

A tout le personnel du LBMA, grand merci pour tout ce que j'ai appris avec vous.

A mes jeunes frères et camarades académiques Karim KONE et Dr Sékou TRAORE pour leur soutien dans la réalisation de ce travail.

A tout le personnel du CSCom de Dioro pour leur hospitalité profonde et sans pareil surtout pendant la période de cette étude.

A mes MAITRES de la Faculté de Pharmacie pour leur enseignement édifiant et instructif.

Aux membres de la Promotion Pr Boulkassoum HAIDARA, la huitième promotion du *numerus clausus* ; en tant que responsable de classe de la promotion j'ai tissé de bon lien avec vous et j'espère que nous continuerons cette sincère collaboration dans la vie professionnelle.

A mes amis : Brahima SANOGO, Sidiki PEROU, Noé SAYE, Ousmane YOSSE, Diakalia TRAORE, Dr Ali KONE, Abdoul Karim DIARRA, Yessa DOUYON, Boucary DOUYON, Assétou TRAORE, Adama CISSE, Dr Moussa DAO, Founke SISO, Cheick Oumar GUINDO, Aïssata HAIDARA, Adama DIALLO, Aliou Dembélé, Demba Oumar Diakité etc.

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

Au collectif des responsables de classe (CRC) pour leur franche collaboration dans l'organisation des cours.

A mon binôme Dr Jean Paul Lowes ESSOH pour toutes ces nuits blanches passées ensemble pour la préparation des examens. Je n'oublierai jamais ces moments de travail dur et cela va me manquer.

A mes grands frères académiques : M. Ibrahim KEITA, Dr Youssouf DIARRA, Dr Lassina DOUMBIA, Dr Adama KONE, M. Ibrahim TRORE, je vous remercie pour avoir valablement joué votre rôle protecteur et affectif d'aîné.

A mes jeunes frères académiques : Soumaila SAGARA, Jacob DARA, Fanta GORO, Souleymane GORO, Ousmane COULIBALY, Abdoulaye SANOGO, Abdoulaye SANGARE, Issouf BENGALY, Zoumana COULIBALY, Mohamed SINGARE Youssouf DOUYON, Abdoulaye DOUYON, Elly TOGO, vous m'avez toujours réservé cette place d'aîné à la faculté et partout ailleurs. Soyez rassurés, non seulement je vous remercie sincèrement pour ces considérations mais je vous fais l'assurance d'assumer ce rôle d'aîné que vous pourrez attendre de ma modeste personne.

Au personnel de la Pharmacie CARREFOUR LAFIA, de la Pharmacie NASSOUMBA.

**HOMMAGES
AUX MEMBRES
DU JURY**

A notre Maitre et Président du Jury

Professeur Ababacar I MAIGA

- ✓ Professeur titulaire de Toxicologie à la faculté de Pharmacie ;
- ✓ Ancien Directeur Adjoint de la DPM ;
- ✓ Vice-Doyen de la Faculté de Pharmacie.

Permettez-nous de vous remercier pour l'honneur que vous nous faite en acceptant de présider ce jury de thèse.

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

Votre modestie et votre amour pour le travail bien fait font de vous un maitre exemplaire.

Veillez accepter cher Maitre l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maitre et Jury

Professeur Ibrahim I. MAÏGA

- ✓ Médecin biologiste ;
- ✓ Chef de service du Laboratoire du CHU du Point G ;
- ✓ Professeur titulaire de bactériologie-virologie à la Faculté de Médecine ;
- ✓ Responsable des cours de bactériologie-virologie à la faculté de Médecine ;
- ✓ Ancien Vice-Doyen de la FMPOS

Cher Maître, c'est un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Votre rigueur scientifique et votre intérêt pour le travail bien fait en général font de vous un Maître à admirer. Soyez rassuré de notre reconnaissance la plus profonde.

A notre Maitre et Jury

Professeur Akory Ag IKNANE

- ✓ Président du Réseau Malien de Nutrition (REMANUT) ;
- ✓ Secrétaire général de la Société Malienne de Santé Publique (SOMASAP) ;
- ✓ Maître de conférences en Santé Publique à la FMOS et FAPH ;
- ✓ Ancien Directeur Général de l'Agence Nationale d'Investissement des Collectivités Territoriales (ANICT) ;
- ✓ Ancien Directeur Général de l'Agence Nationale pour la Sécurité Sanitaire des Aliments (ANSSA) ;
- ✓ Ancien chef de service de Nutrition à l'INRSP ;
- ✓ Premier Médecin Directeur de l'ASACOB.

Cher Maître, c'est un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Votre rigueur scientifique et votre intérêt pour le travail bien fait en général font de vous un Maître à admirer. Soyez rassuré de notre reconnaissance la plus profonde.

A notre Maître et co-directeur de thèse
Docteur Lassina DOUMBIA

- ✓ Docteur en Pharmacie ;
- ✓ Assistant de recherche au LBMA ;

Cher Maître,

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

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

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

Soyez-en félicité pour ce caractère !

A notre Maître et Directeur de thèse
Professeur Ousmane KOITA

- ✓ Pharmacien Biologiste ;
- ✓ Professeur titulaire de Parasitologie Moléculaire ;
- ✓ Responsable des cours de Biologie Moléculaire appliquée à la Faculté des Sciences et Technique (FST) et Biologie Animale à la Faculté de Pharmacie (FAPH) ;
- ✓ Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) ;
- ✓ Professeur Assistant de Médecine Tropicale à Titre étranger, Université de Tulane ;
- ✓ Ancien directeur adjoint du programme SEREFO.

Cher Maître,

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

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

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

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

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

Amen !

Liste des tableaux

Tableau I: Profil macro nutritionnel du son de riz (1-3 grammes).....	7
Tableau II: Interprétation des caractères morphologiques des cultures sur Hektoen	45
Tableau III : Composition du milieu citrate de Simmons	47
Tableau IV: Composition du milieu synthétique.....	49
Tableau V: Mélange réactionnel pour l'amplification de l'ARNr 16S par PCR.....	54
Tableau VI: Le programme d'amplification de l'ARNr 16S par PCR.....	54
Tableau VII: Mélange réactionnel pour la digestion enzymatique.....	56
Tableau VIII:Listes des amorces utilisées (37)	57
Tableau IX: Composition du mélange réactionnel pour la PCR multiplexe	58
Tableau X: programme de l'amplification par PCR.....	59
Tableau XI: Répartition des enfants enrôlés en fonction du genre.....	63
Tableau XII: Répartition de la consommation mensuelle en fonction de la tolérance et de la conformité du son de riz stabilisé à la chaleur.	63
Tableau XIII: Répartition des épisodes diarrhéiques par groupe d'étude.	64
Tableau XIV : Les concentrations médianes des biomarqueurs du dysfonctionnement entérique environnemental(DEE) dans les selles mesurées aux 6 ^{ème} , 8 ^{ème} , 10 ^{ème} et 12 ^{ème} mois.	68
Tableau XV : Résultats de tests biochimiques	71
Tableau XVI : Nombre de sites de restriction par échantillon en comparaison avec ceux des espèces d'E.coli.	76
Tableau XVII: Classification des sites de restriction en haplotypes	76
Tableau XVIII : Répartition des selles diarrhéiques selon le groupe d'étude et la technique utilisée ..	78
Tableau XIX: Résultat de l'amplification de l'ADN par les amorces spécifiques.	79
Tableau XX : répartition des souches pathogènes d'E.coli	80

Liste des figures

Figure I: Les composants du son de riz	6
Figure II : Sites de colonisation des <i>Escherichia coli</i> pathogènes (18).....	15
Figure III: Situation géographique de la commune rurale de Dioro au Mali	32
Figure IV: Lecture et interprétation des tests biochimiques	51
Figure V: Consommation du son de riz avec les aliments divers.....	64
Figure VI: Poids-pour-Age Z-Score.....	65
Figure : VII Taille-pour-Age Z-Score	66
Figure VIII: Poids-pour-taille Z-Score	66
Figure IX: Résultat de biomarqueur néoptérine responsable de l'inflammation intestinale.	69
Figure X: Résultat de biomarqueur calprotectine responsable de l'inflammation intestinale.	69
Figure XI: Résultat de biomarqueur Alpha-1-Antitrypsine responsable de la perméabilité intestinale et du transfert de protéines dans la circulation sanguine.....	70
Figure XII : Taille des amplicons de l'ARNr 16S.....	72
Figure XIII: Profil sans enzyme des 16 souches d' <i>E.coli</i> isolées dans les selles diarrhéiques.	73
Figure XIV: Profil RFLP avec l'enzyme <i>Hae III</i> des 16 souches d' <i>E.coli</i> isolées dans les selles diarrhéiques.	73
Figure XV: Profil RFLP avec l'enzyme <i>AluI</i> des 16 souches d' <i>E.coli</i> isolées dans les selles diarrhéiques.	74
Figure XVI: Profil RFLP avec l'enzyme <i>EcoRI</i> des 16 souches d' <i>E.coli</i> isolées dans les selles diarrhéiques.	75
Figure XVII: Dendrogramme des 16 souches d' <i>E.coli</i> isolées dans les selles diarrhéiques et les souches d' <i>E.coli</i> thermo tolérant contrôle.	77
Figure XVIII: Amplification de souches d' <i>Escherichia coli</i> par la PCR avec les amorces spécifiques.	79

Liste des abréviations

AAT : Alpha-1-Antitrypsine

ANSSA : Agence National pour la Sécurité Sanitaire des Aliments

ASACO : Association de Santé Communautaire

CAL : Calprotectine

CF : Calprotectine Fécale

CSCOM : Centre de Santé Communautaire

DEE : Dysfonction Entérique Environnementale

EAEC : *Escherichia coli* Entéroagréatives

EDSM : Enquête Démographique et Sanitaire du Mali

EHEC : *Escherichia coli* Entérohemorragiques

EIEC : *Escherichia coli* Entéroinvasives

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPEC : *Escherichia coli* Entéropathogènes

ETEC : *Escherichia coli* Entérotoxinogènes

FRC : Formulaire de Report de Cas

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

INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique

LAZ: Length-Age-Z-Score

LBMA: Laboratoire Biologie Moléculaire Appliquée

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MO : mois

MPO: Myéloperoxydase

MUG: 4-Methyl-Umbellifeny β -D-Glucuronide

NEO : Néoptérine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCIME : Prise En Charge Intégrée des Maladies de l'Enfant

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFR : Pays à Faible Revenu

PRI : Pays à Revenu Intermédiaire

PVM : Projet Villages du Millénaire

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RVO : Réhydratation par Voie Orale

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

SRB : Rice Bran Supplementation

SRO : Solution de Réhydratation Orale

TBE : Tris Borate EDTA TDA : Tryptophane Désaminase

UNICEF: United Nation International Children's Emergency Fund

USA: United State of America

WAZ: Weight-Age-Z-Score

WLZ: Weight-Length-Z-Score

Table des matières

1.	Introduction	1
2.	Objectifs	4
2.1.	Objectif général	4
2.2.	Objectifs spécifiques	4
3.1.	Le son de riz	6
3.2.2.	Epidémiologie	10
3.2.3.	Agents pathogènes (18)	11
3.2.4.	Mécanismes physiologiques de la diarrhée (21).....	11
3.2.5.	Diagnostic (23)	12
3.2.6.	Etiologies (21)	12
3.2.7.	Traitement de la diarrhée (18)	21
3.2.8.	Prévention.....	25
3.3.	Dysfonction entérique environnementale (DEE)	26
3.3.1.	Les biomarqueurs du dysfonctionnement entérique.....	26
3.3.2.	Impact de la DEE sur la santé et la nutrition	29
4.	Méthodologie.....	32
4.1.	Site d'étude.....	32
4.2.	Type et période d'étude	34
4.3.	Population d'étude et échantillonnage.....	34
4.4.	Eligibilité des participants	34
4.5.	Interventions.....	35
4.5.1.	Intervention diététique de supplémentation.....	35
4.5.2.	Techniques de laboratoire réalisées lors du suivi des nourrissons	36
4.8.	Etude moléculaire	53
4.11.	Considérations éthiques et déontologiques.....	60
4.12.	Gestion des données	61
5.	Résultats	63
5.1.	Facteurs démographiques	63
6.	Commentaires et discussion	82
6.1.	Lieu d'étude.....	82
6.2.	Méthodologie.....	82

6.3.	Résultat.....	83
7.	Conclusion et recommandations.....	89
7.1.	Conclusion.....	89
7.2.	Recommandations	89

INTRODUCTION

1. Introduction

Pendant les 6 premiers mois de la vie, il est recommandé que les bébés soient exclusivement allaités pour une croissance et un développement appropriés **(1)**. Après cette période, les compléments alimentaires sont introduits dans le régime du bébé. Au Mali, les aliments de sevrage comprennent le mil, le maïs, le riz et le haricot **(1)**.

L'introduction du son de riz dans les aliments de sevrage est une grande opportunité à cause de son contenu en graisses et protéines, sa digestibilité facile et ses traits hypoallergiques **(2)**. La qualité protéique du son de riz est plus convenable comparée au son des autres céréales, parce qu'il contient une quantité substantielle de lysine et son contenu en acides aminés est souhaitable pour le développement des enfants **(3)**. L'ajout du son de riz aux aliments quand le bébé est en train d'être sevré du lait maternel est une approche prometteuse pour améliorer la qualité nutritionnelle et prévenir les maladies diarrhéiques.

La diarrhée est une affection fréquente, parfois grave et urgente chez l'enfant. Chaque année, 1,7 milliards de cas de diarrhée sont recensés chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde, dont la moitié en Afrique et en Asie du sud avec 525 000 cas de décès **(4)**.

La diarrhée aiguë se définit cliniquement comme une augmentation du nombre (supérieur à trois (03) par jour) et du volume (supérieur à 300 gramme par jour) des selles et par modification de leur consistance (molle ou liquide), son caractère aigu est affirmé par une survenue brutale et évolutive depuis moins de sept (07) jours **(4)**.

Au Mali, la diarrhée constitue le 3^{ème} motif de consultation des enfants de moins de 5 ans, et sa prévalence reste élevée; en effet, 13% des enfants de moins de 5 ans avaient eu un épisode diarrhéique dans les deux (02) semaines précédant l'enquête EDSM-IV (5). Cette prévalence est particulièrement importante chez les nourrissons de 6-11 mois (20%) et de 12-23 mois (22%) (5); ces âges de forte prévalence sont aussi les âges auxquels les enfants commencent à recevoir des aliments autres que le lait maternel et commencent à explorer leur environnement ce qui les expose davantage à la contamination par les agents pathogènes pouvant provoquer un déséquilibre de la flore intestinale.

La dysfonction entérique environnementale (DEE) désigne un syndrome défini de l'altération incomplète et l'inflammation de la muqueuse et de la sous-muqueuse et de la capacité d'absorption intestinale et de fonction de barrière, complication très répandue dans les pays à faible revenu(PFR) et les pays à revenu intermédiaire(PRI) **(6)**. La DEE peut également

expliquer la réduction de l'efficacité des vaccins oraux dans les pays à faible revenu et le risque accru d'infection grave chez les enfants atteints de malnutrition **(7)**.

Des évidences épidémiologiques et cliniques mettent l'accent sur le besoin de nouvelles stratégies d'intervention, concrètes rapidement applicables qui maintiendront : 1] une bonne fonction de la barrière de l'intestin, 2] améliorer l'immunité mucosale et 3] promouvoir l'absorption optimale du nutriment pour le contrôle et la prévention de la diarrhée **(8)**.

Une faille significative existe dans notre connaissance concernant la faisabilité et l'acceptabilité de la supplémentation du régime en son de riz stabilisé par la chaleur chez les enfants qui ont une plus grande susceptibilité au dysfonctionnement entérique environnemental et aux infections diarrhéiques.

Nous avons donc examiné le son de riz comme une nouvelle stratégie pour réduire le dysfonctionnement de l'intestin et le fardeau des maladies diarrhéiques chez les enfants en sevrage à Doro à des niveaux qui peuvent améliorer l'immunité du mucus intestinal.

Le métabolome est constitué de l'ensemble des petites molécules, les métabolites, tels que les intermédiaires métaboliques, les hormones et autres molécules signal ainsi que les métabolites secondaires, qui peuvent être trouvées dans un échantillon biologique (ici selles). Ce terme d'origine anglo-saxonne a été proposé par Oliver *et al.* en 1998 **(9)**. A l'égal des autres systèmes, le métabolome est dynamique et changera donc dans le temps.

Ainsi nous déterminerons si la consommation du son de riz peut moduler le métabolome pour promouvoir l'immunité de l'intestin et réduire les biomarqueurs du dysfonctionnement de l'intestin dont le bénéfice sera la prévention des maladies diarrhéiques qui accroissent le risque de la malnutrition et le retard de la croissance.

OBJECTIFS

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Evaluer la faisabilité et l'acceptabilité de la consommation du son de riz et son impact sur la croissance, le dysfonctionnement entérique et la prévention des maladies diarrhéiques chez les enfants en sevrage à Dioro.

2.2. Objectifs spécifiques

- Décrire le suivi de la consommation du son de riz par les enfants en sevrage pendant les six (06) mois de l'étude à Dioro.
- Déterminer le taux de consommation du son de riz par les enfants en sevrage pendant les six (06) mois de l'étude à Dioro.
- Déterminer le taux des maladies diarrhéiques chez les enfants consommant le son de riz comparé à la supplémentation seule en vitamine A.
- Déterminer la fréquence d'*Escherichia coli* dans les cas de diarrhée observés pendant les six (06) mois de l'étude à Dioro.

GENERALITES

3. Généralités

3.1. Le son de riz

Le son de riz est un ingrédient alimentaire mondial (10)

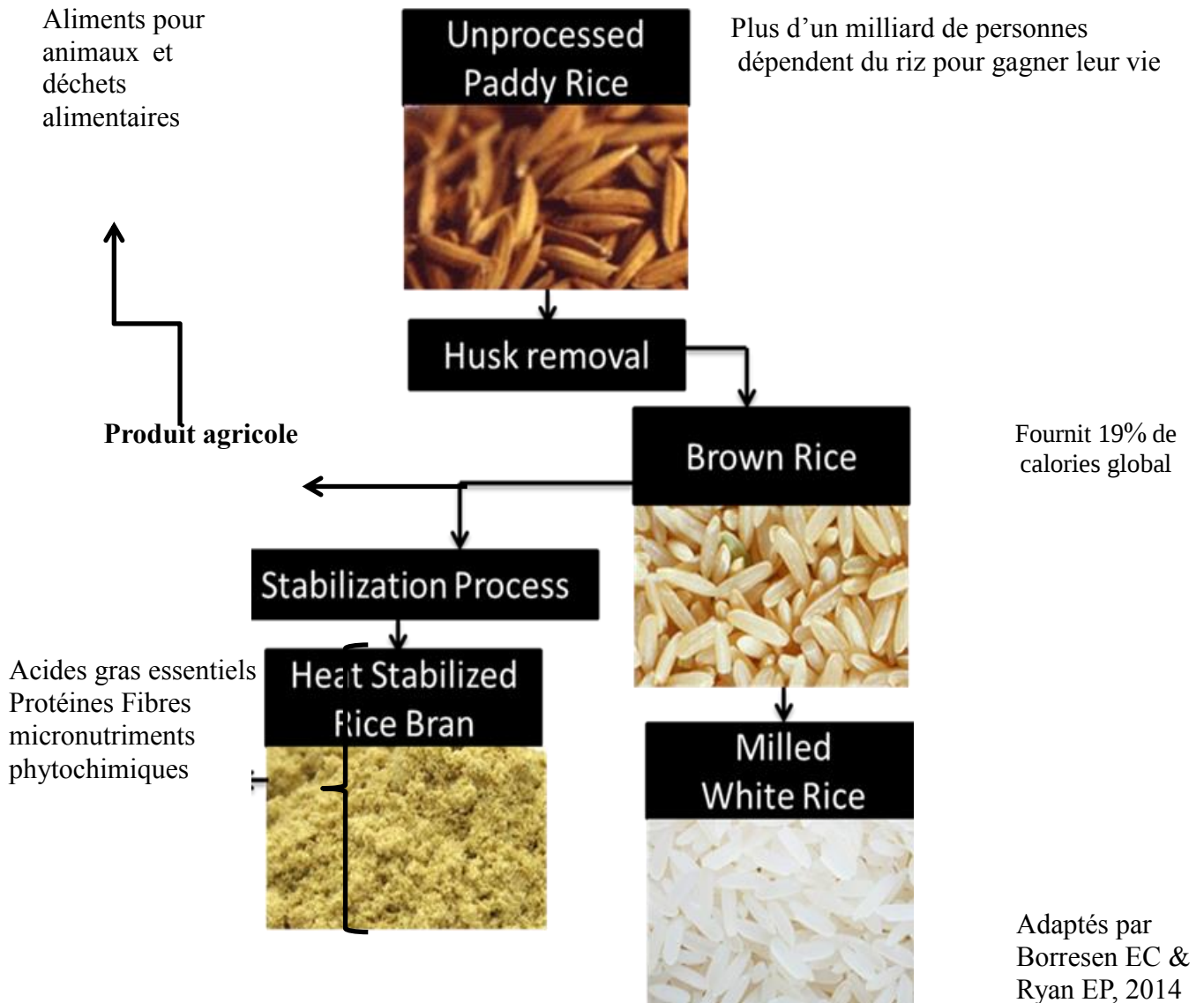


Figure I: Les composants du son de riz

- **Préparation et emballage du son de riz**

Le son de riz biologique est obtenu par abrasion mécanique des grains de riz complets. Il subit ensuite un procédé thermique breveté qui stabilise les composants enzymatiques, empêche le rancissement et surtout préserve l'ensemble des valeurs nutritionnelles de cette partie des grains. Le son de riz représente en effet près de 60% des valeurs nutritionnelles du riz.

Warren Analytical Laboratory (Greely, CO) a conduit une analyse sur le son de riz le 21 Avril 2014. Le son de riz était négatif aux souches d'*E. Coli* et de *Salmonella*.

Vingt-deux (22) kilogrammes de son de riz (variété de Calrose) ont été tamisés à la main au CSU Kendall Anderson Nutrition Center. Le tamisage était nécessaire pour débarrasser le son de riz des résidus d'enveloppe de riz et des grains se trouvant dans le son de riz qui a été fourni par le Département de l'Agriculture des Etats-Unis. Ainsi, le son de riz a été alors transféré à la société Western Innovations Inc. (Denver, CO), où il a été pesé pour obtenir de différents poids d'intervalle 1-1,4 g et ensuite mis dans des sachets étanches de taille 5,08 cm X 7,62 cm. La société Western Innovation a été choisie comme notre partenaire pour l'emballage puisqu'elle est considérée comme le premier des services automatisés d'assemblage et d'emballage. Une formulation de 14 sachets de son de riz a été emballée dans des boîtes de **10,5 cm X 7,62 cm X 5,08 cm** pour fournir une option facile à livrer le son de riz aux participants et leurs familles. Chaque boîte a une étiquette qui indique le nom du produit et l'information nutritionnelle. Il est aussi écrit que le produit n'est pas à vendre.

Vingt-deux milles (22.000) sachets ont été rassemblés pour les besoins de la recherche et conservés dans un endroit frais et sec avec des fluctuations minimales de température.

- **Les principaux constituants du son de riz (10)**

Dans les pratiques empiriques, lorsque leurs enfants étaient malades, les mères avaient pour habitude d'aller au moulin à riz le plus proche pour prendre du son, reconnu pour son pouvoir curatif.

De nos jours, grâce à une meilleure connaissance du riz, la science est capable de donner l'explication de ce comportement. D'excellentes protéines avec un apport de 12 à 16 g/100g, le son de riz fait partie des aliments végétaux présentant une bonne teneur en protéines **(1)**.

Tableau I: Profil macro nutritionnel du son de riz (1-3 grammes)

Son de Riz (grammes)	1	2	3
Calorie (kcal) 3 6 9	3	6	9
Protéine (g)	0,13	0,27	0,4
Matières grasses (g)	0,21	0,42	0,63
Carbohydate (g)	0,5	0,99	1,49
Fibre (g)	0,2	0,4	0,6

Le son de riz est une couche brune présente entre l'endosperme et la coque extérieure du riz C'est un Sous-produit en dépit d'être un nutritif dense produit et stabilisé par un traitement thermique rapide de fraisage. Il peut être utilisé comme ingrédient dans le traitement des

aliments en raison de la protection qu'il offre contre la détérioration de nutriments à haute teneur par des huiles rances. Le son de riz contient divers éléments nutritifs précieux tels que les lipides, les fibres, les protéines et minéraux, et a été utilisé par la cuisson, confiserie, et les industries agroalimentaires en raison de sa haute valeur nutritive.

Une analyse nutritive du son de riz et de ses dérivés indique que les huiles (20-29%), les hydrates de carbone (20-27%) et les protéines (10-15%) sont les trois principales composantes, en plus de plusieurs phytonutriments, antioxydants et minéraux précieux.

Le son de riz est également riche en vitamines du complexe B.

En outre, Il a été rapporté que le son de riz contient des niveaux élevés de Phytochimiques, tels que γ -oryzanol, acide γ -aminobutyrique, tocotriénols, tocophérols, caroténoïdes, acide phytique, phénolique composés, octacosanol et squalène.

Une source d'éléments indispensables le son de riz apporte également toutes les vitamines du groupe B (c'est d'ailleurs l'une des céréales en contenant le plus), qui permettent de bien métaboliser les glucides et qui ont un rôle important au niveau émotionnel. Il contient également de l'acide pangamique, parfois appelé également « vitamine B15 », qui est une substance rare et aurait une action sur l'oxygénation. Il apporte aussi des minéraux : magnésium (5.8- 15.1mg/g), potassium (12-27mg/g), manganèse (0.11- 0.27mg/g), phosphore (13-29mg/g), calcium (0.4-1mg/g), fer (0.1-0.5mg/g) et des traces de zinc. Il contiendrait aussi une petite quantité d'IP6 (inositol hexaphosphate), actuellement à l'étude pour contrer la multiplication des cellules cancéreuses et pour limiter la survenue de calculs rénaux.

- **Consommation du son riz**

Une bonne façon de consommer du son de riz est d'en ajouter à un plat de céréales. Certains les ajoutent à du jus, à des soupes ou même à du yaourt.

Le son de riz est un ingrédient alimentaire globalement accessible et sous utilisé avec une stœchiométrie distincte d'éléments phytochimiques et probiotiques qui provoquent des réponses immunitaires mucorales non spécifiques au niveau de l'intestin **(8,11,12)**.

Le son de riz, un sous-produit agricole du traitement du riz, présente des preuves visant à prévenir les maladies diarrhéiques chez les animaux et favorise favorablement la santé et l'immunité intestinales chez l'homme. Ce sous-produit de la manipulation du riz (excédant 70 millions de tonnes par an) est un nouvel ingrédient alimentaire qui a montré une résistance innée et augmentée contre les pathogènes entériques et bactériens (par exemple les salmonelles non typhiques, NTS) qui causent la diarrhée **(11)** et que l'enrichissement du lait

avec le son de riz (équivalent à 10% de la consommation journalière de calories) ingéré par les nouveau-nés des cochons gnotobiotiques infectés par des rota virus humains a réduit significativement la diarrhée **(1)**.

Des mécanismes multiples de l'induction de l'immunité mucosale étaient identifiés et qui soutiennent la preuve de concept que l'augmentation du régime en son de riz réduit la susceptibilité de l'hôte aux infections entériques à travers un renforcement de l'immunité mucosale de l'intestin **(1)**.

L'induction de la quantité de *Lactobacilles* de l'intestin, et les niveaux d'IgA des selles et du sérum, aussi bien la réduction de la présence de salmonelle dans les selles après l'administration par voie orale chez les souris est une évidence forte qui supporte la transposition des investigations chez les êtres humains, particulièrement dans les zones où les infections aux salmonelles non typhiques ou autres bactéries intestinales sont fortement prévalentes. Chez l'Homme, une formulation des protéines à base du son de riz a été développée comme un aliment complémentaire pendant le sevrage, et elle était testée pour son acceptabilité chez les enfants.

Etant donné son importance globale en santé publique, la réduction et la magnitude des épidémies des maladies diarrhéiques par le son de riz et sa capacité potentielle de moduler les marqueurs du dysfonctionnement entérique est cruciale dans les pays en voie de développement **(12–15)**.

3.2. La diarrhée

3.2.1. Définition

On définit généralement la diarrhée aigüe par l'apparition brutale de selles trop liquides ou trop molles et abondantes et ou vomissement avec ou sans crampes abdominales au moins (03) trois fois par 24 vingt-quatre mais persistant moins de (07) sept jours **(4)**.

A noter que la normalité du transit intestinal chez l'enfant est à apprécier en fonction de son âge et du régime alimentaire:

- 5 à 6 selles jaunes et grumeleuses, postprandiales en cas d'allaitement maternel.
- 3 selles molles ou pâteuses par jour en cas d'allaitement artificiel.
- 2 selles moulées, marron par jour chez l'enfant au régime diversifié **(4)**.

3.2.2. Epidémiologie

La diarrhée est répandue dans le monde entier ; elle est à l'origine de 4% de tous les décès et de 5% des incapacités. Elle est le plus souvent causée par des infections gastro-intestinales qui tuent chaque année environ 2,2 millions de personnes dans le monde, pour la plupart des enfants dans les pays en développement **(4)**.

La diarrhée constitue la deuxième cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans **(16)**.

De par le monde, 1,2 milliard de personnes pratiquent la défécation en plein air, dont 83% sont répartis dans 13 pays : Inde (665 million personnes) Indonésie, Éthiopie, Pakistan, Chine, Nigeria, Brésil, Bangladesh, Soudan, Népal, Niger, Vietnam, Mozambique **(17)**.

Quinze pays seulement recensent près de trois quarts des décès dus à la diarrhée chez les enfants de moins de cinq ans **(18)**.

La liste de ces pays (classés par ordre descendant de nombre de décès) est la suivante : Inde, Nigéria, RDC, Afghanistan, Éthiopie, Pakistan, Bangladesh, Chine, Ouganda, Kenya, Niger, Burkina Faso, Tanzanie, Mali, Angola **(16)**.

Dans le monde, près de 900 millions de personnes n'ont pas accès à l'eau potable et 2,6 milliards n'ont pas accès à des équipements sanitaires salubres. Près de 20 % de la population mondiale pratique la défécation en plein air, avec pour conséquence quelques 300 millions de tonnes d'excréments humains qui polluent chaque année les eaux propres. Cette situation socio-sanitaire est directement responsable de l'importance des maladies d'origine hydrique comme la diarrhée **(16)**.

Au Burkina Faso, une étude faite sur les diarrhées aiguës a montré que les maladies diarrhéiques constituent un problème majeur de sante publique qui touchent avec prédilection les enfants à bas âge à Ouagadougou avec une prévalence de 55,7 % de cas chez les moins de 1 an) **(19)**.

Au Sénégal, une étude faite par TESSIER à Dakar sur la mortalité et la morbidité pédiatrique a montré que les diarrhées représentaient 14% des causes d'hospitalisation et occupaient ainsi la première place ; et ce taux atteignait 21% si on ajoutait les diarrhées accompagnant d'autres affections. Elles étaient plus fréquentes chez les enfants de 1 à 23 mois avec 83% des cas **(20)**.

Au Mali, la diarrhée est la troisième cause de la morbidité chez les enfants **(5)**.

Une étude faite en 2001 -2002 par Ousmane Sy a trouvé la malnutrition isolée comme première cause de mortalité (31,7% des décès), suivie du paludisme (23,9% des décès) et la diarrhée (20,4% des décès) **(18)**.

Lamine Bakayoko, dans son étude sur la morbidité et la mortalité (2002-2003) a montré que les maladies diarrhéiques étaient la deuxième cause de mortalité et de morbidité à Sikasso. Elles constituaient la deuxième cause d'hospitalisation pédiatrique dans l'Hôpital Régional de Sikasso avec une fréquence de 5,64% en 2002 ; 8,84% en 2003 ; et 5,02% en 2004. Elles étaient présentes à tout âge mais prédominaient chez les enfants de moins de 5 ans, isolées ou associées à d'autres pathologies. Elles représentaient la deuxième cause de décès chez les enfants avec : 17,30% en 2002 ; 3,17% en 2003 ; et 12,30% en 2004 **(18)**.

Cependant, la prise en charge thérapeutique, notamment la réhydratation par voie orale (RVO), qui est devenue la référence depuis les années 1970, a entraîné une nette diminution de la mortalité dans les pays en voie de développement.

3.2.3. Agents pathogènes (18)

- **Transmission des agents responsables.**

Un certain nombre de comportements spécifiques facilite la propagation des germes entéropathogènes et ainsi, accroît le risque de diarrhée. Les agents infectieux responsables de la diarrhée sont également propagés par la voie féco-orale, notamment par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par les selles ou par contact direct avec des selles infectées.

Il s'agit de:

- Allaitement artificiel, même partiel pendant les 4-6 premiers mois de la vie. Le risque de contracter une diarrhée grave est beaucoup plus élevé chez les nourrissons qui ne sont pas alimentés au sein que chez ceux qui le sont exclusivement; le risque de mort par diarrhée est également nettement plus élevé ;
- Utilisation de biberons; ces derniers sont facilement contaminés par les bactéries fécales et difficiles à nettoyer.

3.2.4. Mécanismes physiologiques de la diarrhée (21).

Selon l'agent causal, plusieurs mécanismes physiopathologiques peuvent s'associer pour conduire à une diarrhée aigüe, par perturbation du cycle entéro-systémique de l'eau.

Les diarrhées bactériennes sont de deux types : toxinique ou invasif.

- **Le mécanisme enterotoxinique :**

Il correspond à la présence d'une bactérie sécrétant une enterotoxine (*Vibrio cholerae*, *Shigella*, *E. coli* Enterotoxinogene ; *Clostridium*...) qui provoque une hypersécrétion d'eau et d'électrolyte suite à l'activation de l'adénylate- cylase membranaire des entérocytes.

Le risque de déshydratation est élevé car la diarrhée induite est aqueuse et profuse, de type cholériforme.

- **Le mécanisme entéro-invasif :**

Il correspond à l'invasion de la muqueuse digestive par une bactérie (*Campylobacter*, *Yersinia*, *E. coli*, Entéro-invasif, *Salmonella*) provoquant ainsi une réaction inflammatoire intense de cette muqueuse puis la destruction par nécrose des entérocytes.

3.2.5. Diagnostic (23)

- **La recherche de virus dans les selles**

Seuls le rotavirus et l'adénovirus peuvent être détectés avec des moyens simples (techniques immuno-enzymatiques) dans les selles.

En fait, la recherche du virus dans les selles n'a aucun intérêt pratique puisque elle n'a pas d'incidence thérapeutique. Elle peut cependant être réalisée dans un but épidémiologique ou au cours de certaines situations épidémiques, en particulier chez les enfants vivants en collectivité.

- **Recherche de parasites intestinaux dans les selles**

Elle se fait par la coprologie des selles à la recherche des formes végétatives, des oocystes ou encore des œufs d'helminthes.

- **Diagnostic différentiel**

La diarrhée aiguë du nourrisson doit être distinguée des selles d'un nourrisson nourri au lait maternel

Un nourrisson nourri au lait maternel a des selles liquides au nombre de 6 à 8 par jour, mais prend du poids régulièrement.

C'est cette prise de poids qui permet d'exclure une diarrhée aiguë.

3.2.6. Etiologies (21)

Une origine infectieuse est le plus souvent en cause.

3.2.6.1. Il s'agit le plus souvent d'un virus

Les diarrhées virales représentent 50 à 80 % des diarrhées aiguës de l'enfant. Le rota virus, essentiellement du groupe A, est le virus le plus fréquemment responsable, mais d'autres agents viraux (Adénovirus, Coronavirus, Astrovirus, Calicivirus, Entérovirus) sont parfois retrouvés. Le rotavirus est facilement identifiable dans les selles par des techniques immuno-enzymatiques (ELISA), alors que la détection des autres virus pose plus de problèmes techniques.

Les diarrhées d'origine virale sont habituellement abondantes et aqueuses, et souvent précédées ou accompagnées de fièvre et de vomissements.

Il n'existe pas de traitement spécifique.

3.2.6.2. Il s'agit parfois d'une bactérie

Les diarrhées d'origine bactérienne ne représentent que 5 à 10 % des diarrhées aiguës de l'enfant.

Les principaux germes en cause sont les suivants :

- ***Escherichia coli***

- **Taxonomies et définition : (21)**

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles à Gram négative, non sporulés, anaérobies facultatifs et qui ne possèdent pas d'oxydase. Le genre *Escherichia* compte 5 espèces : *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. blattae*. L'espèce *E. coli* est considérée comme un hôte normal, c'est-à-dire commensal, de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud.

La niche écologique de cette bactérie se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du côlon. Etant donné qu'elle est hautement compétitive dans cet environnement, *E. coli* reste la bactérie anaérobie facultative la plus abondante dans le côlon humain, dans celui d'autres mammifères et des oiseaux .

Les souches commensales d'*E. Coli* sont donc très bien adaptées à une « coexistence pacifique » avec l'hôte.

Cependant, *E. coli* a été mise en cause pour la première fois dans l'étiologie de l'entérite infantile lorsque Théodore Escherich isola ces micro-organismes lors de cas de diarrhée de nourrissons en 1885.

Durant les années 1920 et 1930, plusieurs chercheurs essayèrent d'identifier les types spécifiques d'*E. Coli* responsables des entéropathies, mais aucun progrès significatif ne fut réalisé jusqu'à la mise au point par Kauffmann, dans les années 1940, d'un schéma de sérotypes précis.

Ainsi, à partir des années 1950, de nombreuses souches d'*E.coli* appartenant à des sérotypes particuliers ont été répertoriées, chez l'homme comme chez l'animal, comme étant des souches pathogènes responsables d'affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères voire mortelles.

Les souches d'*Escherichia coli* se trouvent dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, y compris les humains, où elles jouent généralement le rôle des bactéries commensales.

Cependant, par acquisition et combinaison de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques, ces souches commensales normalement inoffensives peuvent devenir des agents pathogènes très adaptés capables de causer des maladies diarrhéiques.

Ainsi, on peut distinguer deux grands groupes de souches d'*E. Coli* pathogènes: des souches d'*E. Coli* pathogènes « intestinales » (EHEC, EPEC, EAEC...) et des souches de *E. coli* pathogènes « extra intestinales » (Ex PEC).

Notre travail se limitera aux souches pathogènes intestinales parce qu'il apparaît important d'approfondir les connaissances scientifiques sur ces bactéries et établir leur implication dans les diarrhées chez les enfants en sevrage dans le village de Dioro.

Les *E. coli* à l'origine de maladies intestinales ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes. Elles se retrouveront donc dans les fèces et par la suite dans les effluents animaux (élevages et abattoirs) et les effluents d'origine humaine. Ce groupe de pathogènes est subdivisé en 6 pathovars majeurs selon le type de maladie engendrée et les facteurs de virulence associés : les ETEC (*E. coli* Entérotoxinogènes), les EHEC (*E. coli* Entérohémorragiques), les EPEC (*E. coli* entéropathogènes), les DAEC (*E. coli* à adhérence diffuse), les EAEC (*E. coli* entéroagréguantes) et les EIEC (*E. coli* entéroinvasives).

E. coli entéropathogènes (EPEC), *E. coli* Entérotoxinogènes (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) colonisent l'intestin et sont à l'origine de diarrhée, alors que *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC) et *E. coli* entéroinvasives (EIEC) colonisent plutôt le côlon; *E.*

coli entéroagrégatives (EAEC) peut coloniser les deux.

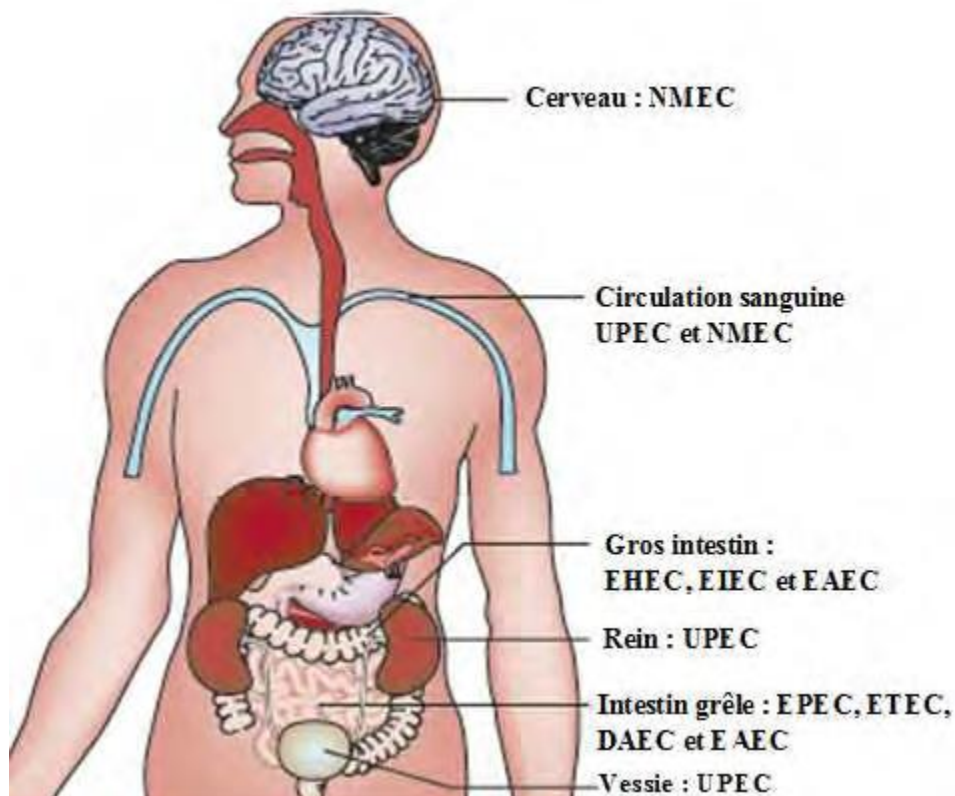


Figure II : Sites de colonisation des *Escherichia coli* pathogènes (18)

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.

Les pathogènes intestinaux :

Les pathogènes intestinaux d'*E.coli* appartiennent pour la plupart aux groupes phylogénétiques A/B1/E et sont reconnus comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique.

Six principaux pathovars classifiés en fonction des signes cliniques et des facteurs de pathogénicité exprimés sont inclus dans ce groupe.

○ **Les *Escherichia coli* Entérotoxigènes (ETEC) :**

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

sont également importantes dans les fermes, les porcelets en post-sevrage sont fortement susceptibles à l'infection.

Les ETEC appartiennent au séro groupe : O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 et O173.

- **Les *Escherichia coli* Entéroinvasives (EIEC)**

Les EIEC et les shigelles sont souvent classés dans le même groupe de pathovar avec des caractères biochimiques, antigéniques, génétiques et fonctionnels très proches, et possèdent une stratégie d'infection similaire.

Les EIEC sont responsables de syndrome dysentérique caractérisé par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse évoluant rapidement vers une dysenterie (diarrhée contenant du sang et du mucus). Cependant, *Shigella* est une bactérie à localisation intracellulaire qui n'a ni flagelles ni des facteurs d'adhésion. Elle est fortement infectieuse et est responsable de la dysenterie bacillaire avec diarrhée sanglante.

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

Les DAEC sont un groupe hétérogène qui produit une adhérence diffuse sur cellules Hela et HEp-2.

Cette adhérence est favorisée par des protéines codées par une famille d'opérons, qui incluent à la fois les adhésines fimbriales (Dr. et F1845) et les adhésines afimbriales réunies sous le nom de Afa-Dr. Les isolats de DAEC qui expriment Afa-Dr en colonisant l'intestin grêle, engendrent des cas de diarrhée chez les enfants entre 5 et 18 mois d'âge. Par ailleurs, ils peuvent coloniser le tractus urinaire et être à l'origine d'infection urinaire récurrente chez l'adulte.

- **Les *Escherichia coli* entéroagréatives (EaggEC, ou EAEC)**

Considérés comme des pathogènes émergents, les EAEC sont la deuxième cause de diarrhée des voyageurs après ETEC dans les pays développés et en voie de développement. Les EAEC sont également reconnues comme une cause de diarrhée endémique et épidémique dans le monde entier. La diarrhée provoquée par les EAEC est souvent aqueuse, mais elle peut être accompagnée de mucus ou de sang.

La colonisation des EAEC peuvent se produire dans la muqueuse de l'intestin grêle et du gros intestin et évoluer vers une inflammation progressive dans le côlon.

Les souches EAEC se caractérisent par un type d'adhésion agrégative en " briques empilées " à l'origine de nécrose au pôle apical des villosités avec œdème inflammatoire et hémorragique de la sous muqueuse. Ce modèle d'adhésion est codé par des gènes localisés sur une famille de plasmides de virulence appelés les plasmides de pAA. Ces plasmides de 100 kb codent les gènes nécessaires pour la biogénèse des fimbriae d'adhérence agrégative (AAFs) notamment les adhésines de la famille Dr et favorisent l'adhérence d'EAEC à la muqueuse intestinale.

L'expression de la plupart de des facteurs de virulence semble être sous la dépendance de l'activateur de transcription AggR. De plus, les enquêtes épidémiologiques relatives aux souches EAEC montrent que la présence du régulon AggR chez les souches incriminées est associée à l'apparition de cas de diarrhée. Aussi, le terme d'EAEC « typique » a été proposé récemment pour désigner les EAEC possédant le gène *aggR* et quelques gènes régulés par celui-ci par opposition aux souches d'EAEC « atypiques ».

○ **Les *Escherichia coli* entero-pathogènes (EPEC):**

Les EPEC sont responsables de cas de diarrhée sévère chez les enfants dans les pays en voie de développement.

Par contre, dans les pays industrialisés, l'incidence des infections dues aux EPEC a fortement diminué. Mais des cas sporadiques sont encore recensés dans les communautés d'enfants. Les sérogroupes des souches EPEC les plus fréquemment associés à la diarrhée chez l'homme sont O111, O128, O86, O55, O125, O127. En plus de l'homme et des bovins, les souches EPEC sont retrouvées chez d'autres animaux comme le chien, le chat, le lapin, le porcelet, ou bien encore chez la chèvre et le mouton. Les EPEC font parties du groupe des pathogènes entraînant des lésions de type attachement/effacement (A/E) des cellules de l'épithélium intestinal. Dans ce groupe on retrouve aussi les EHEC, les RDEC (« rabbit diarrhoeagenic *E. coli* »), *Citrobacter redentium* pathogène chez la souris et *Escherichia albertii* identifié récemment et autrefois connu comme *Hafnia alvei*.

Les lésions d'A/E des microvillosités sont caractérisées par une adhésion intime des bactéries résultant en une désorganisation du cytosquelette de la cellule hôte et en particulier l'accumulation de l'actine polymérisée pour former des piédestaux en regard de la zone d'adhésion de la bactérie.

Ce phénotype caractéristique des EPEC est codé par des gènes regroupés sur un îlot de pathogénicité de 35 Kb, le LEE pour « locus of enterocyte effacement ».

Le LEE code et régule fortement un système de sécrétion de type 3 (T3SS) qui transfère les protéines effectrices bactériennes dans le cytoplasme de la cellule hôte. Sept effecteurs codés par LEE et plusieurs effecteurs non-LEE (NLe) interviennent dans cette régulation et le rôle de plusieurs de ces effecteurs reste inconnu.

○ **Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)**

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des bactéries pathogènes et zoonotiques qui se retrouvent dans l'eau et parfois dans les aliments. Elles sont responsables de diarrhée, de colite hémorragique et de syndrome urémique hémolytique chez l'homme mais peu ou pas de maladie perceptible chez les animaux considérés comme des réservoirs.

Escherichia coli O157:H7, le sérotype le plus souvent incriminé des EHEC a été isolé en 1982 lors d'une épidémie de colites hémorragiques à la suite de consommation de viande pas assez cuite dans des restaurants « fast food ».

EHEC O157 a été également isolé dans des cas sporadiques de colite hémorragique. L'identification de la production de Shigatoxines (Stxs) à partir des souches EHEC O157 a mené à la découverte de leur rôle dans le développement de syndrome hémolytique et urémique (SHU) et une triade pathologique se composant d'une anémie microangiopathique hémolytique, d'une thrombocytopénie et d'une insuffisance rénale aiguë.

• ***Campylobacter***

Le mode d'action pathogène fait intervenir des propriétés entéroinvasives, et parfois une sécrétion d'enterotoxine.

Les *Campylobacter* le plus souvent en cause sont *C. jejuni* et *C. coli*.

Causes fréquentes de diarrhée aiguë de l'enfant, les *Campylobacter* ont un pic estivo-automnal et sont parfois responsables d'épidémies dans les collectivités.

L'infection se manifeste habituellement par une diarrhée glairo-sanglante fébrile accompagnée de vomissements et de douleurs abdominales intenses.

Les diarrhées à *Campylobacter* entraînent rarement une déshydratation sévère, et les bactériémies sont exceptionnelles. Des arthrites réactionnelles sont cependant possibles.

La reconnaissance du germe nécessite un milieu de culture spécial différent de celui utilisé pour les coprocultures usuelles.

Une antibiothérapie (macrolides) est indiquée lorsque la SymptomatoLOGie est prolongée ou sévère. Elle permet d'éviter les rechutes ou la contamination du milieu familial ou de la collectivité (crèche), et diminue la durée de l'état de porteur (contrairement aux salmonelloses).

Cette antibiothérapie ne réduit la durée de la diarrhée que si elle est instituée dès le début des symptômes, mais cela est généralement incompatible avec le délai d'obtention (3 à 6 jours) de la coproculture.

- **Salmonelles**

La plupart des salmonelles agissent par leurs propriétés entéroinvasives au niveau de l'iléon et du colon. Certaines souches agissent par la sécrétion d'une toxine qui active l'adenylyclase dans l'intestin proximal.

Les salmonelles les plus souvent en cause sont *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Virchow*.

Elles sont habituellement responsables de diarrhées invasives souvent très fébriles. La diarrhée est parfois précédée, voire remplacée, par un iléus trompeur à l'origine d'une constipation.

Les bactériémies et les localisations secondaires ne sont pas exceptionnelles chez le nourrisson. Ainsi, l'hémoculture est parfois positive.

Les salmonelles sont facilement retrouvées par coproculture.

Des épidémies peuvent se rencontrer dans les collectivités.

Un traitement antibiotique (amoxicilline, cotrimoxazole) n'est indiqué qu'en cas de terrain débilité ou s'il existe des signes systémiques persistants, la voie parentérale (céphalosporines) étant parfois préférée pendant les premiers jours. Cependant, dans les formes simples, il n'est pas démontré que l'antibiothérapie modifie l'évolution de l'infection, elle peut même au contraire favoriser le développement de résistances plasmidiques, prolonger le portage de germes, voire accroître le risque de rechute.

Un traitement antibiotique est rarement indiqué en dehors des diarrhées persistantes.

- **Shigelles**

La plupart des shigelles agissent aussi par leurs propriétés invasives au niveau du colon. Certaines souches secrètent une enterotoxine.

Les shigelles le plus souvent en cause sont *S. sonnei*, *S. flexneri*.

Elles sont habituellement responsables de syndromes dysentériques fébriles sévères. L'existence de signes neurologiques (convulsions, obnubilation) ou d'une hyponatrémie sévère est évocatrice.

Les germes sont retrouvés sur la coproculture.

La prescription d'antibiotiques par voie orale (cotrimoxazole) est dans tous les cas presque toujours justifiée.

- ***Yersinia enterocolitica***

Ces germes envahissent et se multiplient à l'intérieur des cellules épithéliales de l'iléon et du colon. Ils ne secrètent pas de toxines.

L'infection survient plus fréquemment sur les terrains débilites ou chez les enfants porteurs d'une hémoglobinopathie.

Le tableau habituel est celui d'une gastroentérite aigue fébrile.

Une yersiniose peut aussi se manifester sous la forme de douleurs abdominales pseudo-appendiculaires en rapport avec une adénite mésentérique. Un érythème noueux ou des arthralgies des petites articulations peuvent parfois survenir au cours de l'évolution.

L'isolement de *Yersinia enterocolitica* par coproculture nécessite l'emploi de méthodes spécifiques de culture qui ne sont pas toujours utilisées, expliquant la fréquente négativité des coprocultures. Un sérodiagnostic est cependant disponible.

Un traitement antibiotique n'est nécessaire qu'en cas de terrain débilité ou hémoglobinopathie. Les tétracyclines (après 8 ans) ou le cotrimoxazole sont les antibiotiques de choix.

- **Staphylocoque**

Certaines souches de *staphylococcus aureus* secrètent une toxine thermostable pouvant être responsable d'une toxi-infection alimentaire avec diarrhée toxinique.

Une diarrhée toxinique apparaît 2 à 4 heures après l'ingestion d'un aliment suspect (pâtisserie).

La coproculture n'a pas d'intérêt diagnostique.

L'antibiothérapie est inutile.

- **Autres agents bactériens**

D'autres agents bactériens ont été isolés dans les selles d'enfants présentant une diarrhée aiguë (*Klebsiella*, *Aeromonas*, *Clostridium difficile*, *Citrobacter*) sans que leur pouvoir pathogène soit véritablement prouvé et leur mode d'action éventuel déterminé.

3.2.6.3. Il s'agit rarement d'un parasite

En France, les lamblases massives et les cryptosporidies (chez l'enfant immunodéprimé) peuvent être à l'origine de diarrhée, plus souvent chronique qu'aigüe.

Chez l'enfant de retour d'un pays tropical, une diarrhée peut être due à une amibiase, une ankylostomiase, une anguillulose, une trichinose ou une bilharziose intestinale. Il s'agit plus souvent d'une diarrhée trainante qu'aigüe.

Des *Candida albicans* sont souvent retrouvés sur les coprocultures, surtout en cas de traitement antibiotique. Ils existent à l'état commensal dans le colon et ne peuvent pas être tenus pour responsables d'une diarrhée, leur traitement (Nystatine, Amphotéricine B) peut être cependant utile pour éviter la survenue d'une dermite du siège.

3.2.7. Traitement de la diarrhée (18)

Les buts du traitement sont :

- **Prévenir et ou corriger la déshydratation ;**
- **Prévenir l'apparition d'une malnutrition ;**
- **Traiter les causes ;**

- **Les moyens**

La boisson y compris le lait maternel

La solution sucrée salée : 1 litre d'eau + 2 pincées de sel à 3 doigts + verre de the N° 8 de sucre en poudre a solution de réhydratation orale (SRO) est composée de :

- ✓ **Chlorure de Na 3,5 g/l ;**
- ✓ **Citrate tri sodique 2,9 g/l ou bicarbonate de Na 2,5 g/l ;**
- ✓ **chlorure de potassium 1,5 g/l ;**
- ✓ **glucose 20 g/l.**

- **Les indications selon la politique nationale de la santé**

Plan A : c'est le traitement de la diarrhée à domicile

Indications : Le plan A s'applique à :

- Un enfant vu dans un CSCOM et qui n'a pas de signe de déshydratation ;
- Un enfant qui sort du plan C ou B ;
- Un enfant à domicile avant d'aller au Centre de santé.

Trois règles fondamentales :

1^{ère} règle : il faut donner plus de liquide que d'habitude liquides : SRO, SSS, lait maternel, eau de riz etc.

Quantité : autant de liquide qu'il en a envie jusqu'à arrêt de la diarrhée.

2^{ème} règle : donner à l'enfant des aliments liquides en abondance pour prévenir la malnutrition.

Aliments : sein, lait, aliments solides

Fréquence : au moins 6 fois par jour, un repas supplémentaire par jour pendant deux semaines après arrêt de la diarrhée.

3^{ème} règle : amener l'enfant à l'agent de santé s'il ne va pas mieux dans les 3 jours ou si l'un des symptômes suivants apparaît

Aggravation de la diarrhée : nombreuses selles liquides, vomissements répétés signes de déshydratation : soif prononcée, incapable de boire.

Autres problèmes : fièvre, sang dans les selles

Ces 3 règles ne pourraient être appliquées efficacement que si la mère a été bien informée par des techniques de communication adaptées.

Plan B

Indications : il s'applique aux malades présentant des signes évidents de déshydratation.

Quantité : la quantité de SRO à donner pendant les 4 premières heures est de : Poids x 75 ml

Il faut réexaminer l'enfant au bout de 4 heures :

- S'il n'est pas déshydraté passer au plan A ;

- Si la déshydratation persiste continuer le plan B ;
- Si la déshydratation s'empire passer au plan C.

Si la mère doit repartir avant la fin du traitement B : lui montrer la quantité de SRO à donner à domicile pendant 2 jours et lui expliquer le plan A à domicile.

Plan C

Il s'applique aux malades présentant une déshydratation sévère.

La voie IV est le traitement de choix :

Ringer lactate a raison de 100 ml/kg pendant 3 heures chez le grand enfant (H1/2 :30 ml/kg et H2, 5 :70ml/kg) et 6 heures chez le nourrisson (H1 :30 ml/kg et H5 :70 ml/kg).

Le SRO prendra le relais dès qu'il sera capable de boire à raison de 5 ml/kg/heure.

Il existe aussi la sonde nasogastrique ou la voie orale en cas d'impossibilité de faire la voie IV.

L'enfant doit être réexaminé heure par heure jusqu'à la fin de la période de réhydratation prévue (3-6 heures). Si suspicion de cholera chez un enfant de plus de 2 ans on y associe une antibiothérapie par voie orale.

Traiter les autres problèmes

Les complications liées à la réhydratation : troubles électrolytiques et acido-basiques : donner du

- SRO ;
- Echec de la RVO : faire IV ;
- Convulsion : donner du diazépam et traiter la cause.

Les traitements médicamenteux ont une place très restreinte (recommandations du Groupe francophone d'hépatologie, gastro-entérologie et nutrition pédiatrique – Juin 2002)

a. Une antibiothérapie est rarement indiquée.

Il n'existe pas de réel consensus sur les indications d'une antibiothérapie de première intention dans les cas de diarrhées aiguës de l'enfant.

Selon le germe :

- *Shigella* ;
- *Salmonella* Typhimurium;
- *Vibrio cholerae*;

Selon le contexte clinique et/ou le terrain :

- *E. coli* Entéropathogènes ;
- *Salmonella* ;
- *Yersiniose* ;
- *Campylobacter jejuni*.

Selon le terrain :

- nourrisson de moins de trois mois ;
- dénutrition sévère ;
- maladie préexistante (déficit immunitaire...)

Selon la clinique :

- syndrome toxi-infectieux ;
- diarrhée glairo-sanglante prolongée plus de sept jours ;
- hémocultures positives.

b. Les autres médicaments sont :

▪ **Anti parasitaires**

Le loperamide (Imodium) est contre-indiqué avant 2 ans (risques de septicémie à point de départ digestif).

L'intérêt des protecteurs de la muqueuse intestinale (smectite, actapulgite), des ferments lactiques et des levures est faible, sinon nul.

Le racecadotril (Tiorfan) est le seul médicament dont l'efficacité et l'innocuité ont réellement été démontrées dans les diarrhées aiguës de l'enfant.

Liquide : SRO continuer l'alimentation selon le plan A

Suivi : 2 jours. S'il n'y a pas d'amélioration il faut changer d'antibiotique.

Diarrhée persistante remplacer les liquides et les électrolytes par SRO ou IV le traitement nutritionnel est le point le plus important : il faut diminuer la quantité de lait animal ou lait

fermente, augmenter l'apport énergétique avec 6 repas/ jour, poursuivre l'allaitement au sein, donner des multi vitamines à revoir dans cinq jours traitement médicamenteux en fonction du germe en cause.

3.2.8. Prévention

- **Prophylaxie**

Conseils hygiéno-diététiques

Certaines règles hygiéno-diététiques sont à même de réduire le nombre de diarrhées.

Pour éviter les diarrhées d'origine virales: se laver les mains avec du savon ou utiliser des désinfectants à base d'alcool, plusieurs fois dans la journée, plus particulièrement après chaque passage aux toilettes et avant chaque repas, afin d'éviter la contamination.

En cas de manifestation de la diarrhée, quelle que soit son origine :

- Consommer du riz et boire son eau de cuisson, des bouillons de légumes surtout à base de carottes, des bananes, des pommes et des coings, du pain complet et cesser de manger si les malaises reviennent ;
- Eviter produits laitiers, jus d'agrumes, viandes, aliments gras et aliments crus ;
- Boire régulièrement de l'eau minérale pour compenser la perte en minéraux par petites quantités ;
- Eviter les boissons contenant de la caféine, qui ont pour effet d'augmenter les pertes d'eau et de sels minéraux **(24)**.

- **Vaccination**

Contrairement à d'autres pathogènes, le Rotavirus appartient à un groupe de pathogènes dont l'élimination sera impossible car le réservoir animal est très important et que l'immunité acquise n'empêche pas les infections. Le but de la vaccination de l'enfant contre le Rotavirus est donc de diminuer voir de supprimer les infections sévères mais non de prévenir toute les infections. Plusieurs études de suivi de cohortes d'enfants de la naissance à l'âge de 2 ans ont démontré que les premières infections sont généralement les plus sévères. La sévérité clinique diminuant en fonction du nombre successif d'infections. L'infection naturelle procure à la fois une immunité homotypique mais également une immunité hétérotypique démontrée par la protection contre des infections sévères liées à une autre souche virale. Cette constatation supporte l'hypothèse de la possibilité d'induire une protection vaccinale contre les infections à Rotavirus.

3.3. Dysfonction entérique environnementale (DEE)

La dysfonction entérique environnementale est largement décrite comme une condition indétectable d'inflammation de l'intestin qui implique une absorption réduite du nutriment, une perméabilité intestinale augmentée et un risque plus élevé de la maladie diarrhéique.

Des évidences épidémiologiques et cliniques concernant une sensibilité élargie et des effets néfastes du dysfonctionnement de l'intestin et des maladies diarrhéiques mettent l'accent sur le besoin de nouvelles stratégies d'intervention, concrètes rapidement applicables qui maintiendront : une bonne fonction de la barrière de l'intestin **(8)**, améliorer l'immunité muqueuse **(11)** et de promouvoir l'absorption optimale du nutriment pour le contrôle et la prévention du dysfonctionnement de l'intestin et des diarrhées **(12)**.

3.3.1. Les biomarqueurs du dysfonctionnement entérique

- **Définition d'un biomarqueur**

Un biomarqueur est un paramètre mesuré qui sert à évaluer un processus physiopathologique ou physiologique, une maladie ou la réponse de l'organisme à une intervention pharmacologique. Lorsque le paramètre utilisé est le résultat d'un dosage ou d'une mesure à partir d'un échantillon biologique, le terme de biomarqueur est utilisé. Ces biomarqueurs peuvent être des outils de diagnostics pour estimer la survenue d'une maladie ou de pronostics, pour suivre la réponse à une intervention thérapeutique **(25)**.

Nous nous limiterons dans ce document aux biomarqueurs diagnostiques.

- **Les différents types de biomarqueurs intestinaux responsables des inflammations :**

- **La calprotectine**

Le complexe de S100A8/S100A9 appelé la calprotectine, est une glycoprotéine de liaison qui fixe le calcium et le zinc de la famille S100 de masse moléculaire totale de 36,5 kD, sécrétée principalement par les polynucléaires neutrophiles, est abondante aussi dans les monocytes et les macrophages, ce qui représente 60% de toutes les protéines cytosoliques dans les neutrophiles. Ces derniers constituent une partie du système immunitaire inné intestinal et traversent la paroi intestinale entraînant une augmentation de la sécrétion de calprotectine qui est excrétée dans les fèces intacte **(26)**.

La synthèse de calprotectine est plus intense lors des phénomènes inflammatoires et son taux est directement proportionnel à la migration des polynucléaires neutrophiles dans la lumière intestinale. La calprotectine fécale (CF) a un seuil de positivité de 50 µg/g de selles, elle représente ainsi un excellent reflet de l'inflammation pariétale digestive. La CF est un

biomarqueur fiable, simple, sensible, reproductible, peu coûteux et non invasif de l'inflammation du tube digestif.

Variations physiologiques :

La calprotectine est une protéine dont le taux est élevé dans tous les fluides de l'organisme dans des proportions variables dépendant des degrés de l'inflammation locale. Cette protéine est physiologiquement augmentée chez les nourrissons (27) et les concentrations sont comparables chez les prématurés et les bébés nés à terme, puis diminue progressivement au cours des premiers mois de vie (28).

Variations pathologiques :

Une concentration normale de la calprotectine chez un patient présentant une symptomatologie digestive évoque l'existence de troubles fonctionnels intestinaux.

A l'inverse, une augmentation de la calprotectine indique l'existence d'une pathologie organique. Il peut s'agir d'une pathologie infectieuse, néoplasique ou inflammatoire. Dans ce dernier cas, la concentration fécale de la calprotectine est le reflet de l'évolutivité du processus inflammatoire développé au niveau de la muqueuse intestinale. Les concentrations fécales les plus élevées sont associées à des maladies inflammatoires intestinales en poussée.

- **L'alpha-1- antitrypsine (34)**

Définition

L'**alpha 1-antitrypsine** ou **α_1 -antitrypsine (A1AT)** est un inhibiteur de la sérine protéase (serpine). Elle protège les tissus contre des enzymes produites par des cellules inflammatoires, particulièrement l'élastase. On la trouve dans le sang humain à des taux de 1,5 à 3,5 grammes/litre. Il existe une fuite intestinale physiologique de protéines chez les sujets sains.

L'exacerbation de ce phénomène conduit au syndrome d'exsudation protéique qui se traduit au plan clinique par une entéropathie exsudative. Ce syndrome d'exsudation protéique est caractérisé par une perte excessive de protéines plasmatiques dans la lumière du tube digestif.

Il a pour origine une augmentation de la perméabilité intestinale aux protéines comme l' α -1-antitrypsine (AAT) qui en relation avec une pathologie touchant la muqueuse ou la sous muqueuse telle que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

L' α -1-antitrypsine est une glycoprotéine synthétisée principalement par le foie, et à un moindre degré, par les cellules épithéliales intestinales et les monocytes. Son poids

moléculaire est de 54 kD (proche de celui de l'albumine qui est de 69 kD). Elle est physiologiquement éliminée dans les selles en très faible quantité et n'est pas dégradée par les enzymes pancréatiques (29). Elle est présente dans le plasma (elle représente 90% des alpha-1-globulines plasmatiques), elle appartient à la famille des serines dont l'activité biologique consiste à inhiber l'activité catalytique de différentes sérines protéases, principalement l'élastase, libérées par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages au cours des poussées inflammatoires (30). Elle n'est ni sécrétée par un processus actif, ni réabsorbée et elle est caractérisée par sa grande résistance vis-à-vis des processus protéolytique d'origine digestive ou bactérienne grâce à sa capacité à former des complexes non résorbables avec les enzymes digestives. C'est donc un excellent marqueur de la fuite protéique intestinale.

Variations physiologiques :

Il existe des variations physiologiques du transit intestinal justifiant le recueil de la totalité des selles pendant 3 jours consécutifs. Les selles obtenus seront donc soigneusement homogénéisées, les dosages seront réalisés sur une aliquote de cet homogénat et les résultats seront rendus en valeur moyenne par 24 heures. Chez l'enfant, la concentration fécale se normalise au niveau de celle de l'adulte sain dès l'âge de 6 jours.

Variations pathologiques :

Il est recommandé de considérer comme anormale une clairance de l'AAT supérieure à 20ml/jour afin de ne pas prendre en compte les augmentations observées en cas de diarrhée avec accélération isolée du transit. En notant que l'excrétion fécale d'AAT étant augmentée en cas de saignement digestif.

- **La Néoptérine**

La néoptérine est une ptéridine produite au sein des macrophages par dégradation du GTP, un nucléotide purique, sous l'effet de l'interféron γ (en), et jouant particulier en signalisation cellulaire du système immunitaire de l'organisme en indiquant un état pro-inflammatoire. Elle sert en particulier de marqueur de l'activation de l'immunité cellulaire.

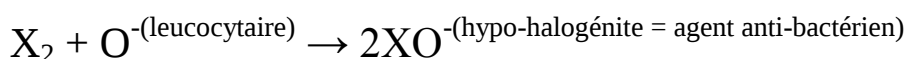
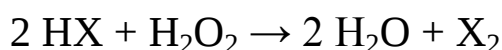
Le taux de néoptérine peut généralement être corrélé avec la progression de la maladie et ainsi permettre de la suivre au cours du traitement des patients (31). Un taux élevé de néoptérine est un bon indicateur d'une évolution défavorable chez les patients atteints du sida, de maladies cardiovasculaires et de divers types de cancers. Il peut être déterminé dans un laboratoire de biologie médicale par dosage radio-immunologique (RIA), par dosage ELISA, ou encore par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

La néoptérine est fluorescente à 353 nm et émet à 438 nm, ce qui la rend facilement détectable après séparation par HPLC.

- **Myéloperoxydase**

La **myéloperoxydase** est une oxydoréductase qui catalyse la réaction :
 $\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HClO} + \text{H}_2\text{O}.$

Il s'agit d'une enzyme halogénodépendante active contre *E. coli* et *L. acidophilus* pour des pH acides (= 5). L'ajout de peroxyde d'hydrogène n'est pas nécessaire pour *Lactobacillus* puisque ce dernier le produit lui-même. L'halogène le plus efficace est l'iode I, suivi du brome Br et du chlore Cl ; le fluor F est inefficace mais le thiocyanate SCN, qui n'est pas un halogène, l'est.



La myéloperoxydase est présente dans certaines cellules phagocytaires du système immunitaire comme les leucocytes polymorphonucléaires (dans les granulations primaires azurophiles) ou les macrophages. La phagocytose des bactéries est suivie de la fusion des vacuoles de phagocytose (phagosome) avec les granulations azurophiles primaires (considérées comme des lysosomes). La myéloperoxydase catalyse alors la formation de l'acide hypochloreux HOCl, espèce réactive de l'oxygène, extrêmement pro-oxydante, qui détruit le pathogène ; c'est le mode de destruction des bactéries extracellulaires par les polynucléaires neutrophiles.

3.3.2. Impact de la DEE sur la santé et la nutrition

- **Impact sur la nutrition et le développement :**

Depuis qu'elle est reconnue, la dysfonction entérique environnementale (DEE) chez les enfants est associée à la sous-nutrition chronique (se manifestant par le retard de croissance), bien qu'il ne soit pas tout à fait clair laquelle des deux est le principal instigateur et laquelle est la conséquence. Hormis la malabsorption, l'inflammation intestinale chronique pourrait avoir un impact sur la croissance de nombreuses autres façons, entre autres par la suppression de l'appétit, car c'est souvent le facteur clé limitant l'apport alimentaire des enfants **(18)**. Ensuite, évoquons la signalisation de l'hormone de croissance. Par exemple, dans le cas de la maladie de Crohn pédiatrique, le retard de croissance est lié à un déséquilibre de l'hormone de

croissance (HC) et du facteur de croissance semblable à l'insuline 1 (IGF-1) provoqué par l'inflammation intestinale chronique. Une situation similaire peut se produire dans le cas de la DEE : en effet, des niveaux inférieurs d'IGF-1 sont associés à des marqueurs inflammatoires supérieurs dans le sang des nourrissons au Zimbabwe (32).

En 2008, un examen systématique de l'efficacité des interventions de nutrition complémentaire existantes dans le cadre de la lutte contre la malnutrition chez les bébés âgés entre 6 et 24 mois a révélé des avantages modérés uniquement, tout en indiquant que la DEE pouvait être un facteur limitant l'efficacité. Les interventions nutritionnelles ne peuvent pas régler à elles seules le problème du retard de croissance chez les nourrissons et les enfants en milieu PFR-PRI – et la DEE pourrait expliquer cette insuffisance.

On estime que la malnutrition a des conséquences dévastatrices pour la santé des enfants. La sous-nutrition (restriction de croissance du fœtus, retard de croissance, émaciation, carence en micronutriments et allaitement insuffisant) est responsable de 45 % des décès chez les moins de cinq ans à travers le monde (33).

Une méta-analyse menée en 2007 a suggéré que chaque année, 200 millions d'enfants n'atteignent pas leur potentiel de développement en raison du retard de croissance (34).

Certaines maladies non communicables à l'âge adulte sont associées à un retard de croissance dans l'enfance, peut-être à cause de la régulation épigénétique (qui fait référence à la modification à long terme dans l'expression des gènes) ou de l'inflammation chronique (35).

- **Impact sur l'immunité**

L'intestin est le théâtre d'une opération de surveillance immunitaire hautement sophistiquée, dont le but est de détecter et de détruire les agents pathogènes potentiels, les empêchant de pénétrer dans le corps, tout en évitant parallèlement les réponses immunitaires inutiles contre les aliments, le microbiote et d'autres matières inoffensives de la lumière intestinale. La présence d'une quantité anormalement élevée de globules blancs dans la paroi intestinale des enfants et des adultes souffrant de la DEE suggère que cette opération de surveillance soit accentuée. L'altération de la fonction de barrière (marque de fabrique de la DEE) fait en sorte que le contenu de la lumière intestinale (dont les bactéries inoffensives ainsi que potentiellement pathogènes) traverse la paroi de l'intestin et active le système immunitaire.

METHODOLOGIE

4. Méthodologie

4.1. Site d'étude

L'étude s'est déroulée dans la commune rurale de Dioro qui relève du district sanitaire de Markala dans le Cercle de Ségou (Région de Ségou).

Le choix de Dioro porte sur sa riziculture par excellence et nous avons l'avantage de travailler sur le plateau technique du laboratoire relevé grâce au programme du Centre International d'Excellence de Recherche sur le Paludisme (ICEMR).

La commune de Dioro est située dans la région de Ségou (une des 10 régions du Mali), à 240 kilomètres de Bamako, la capitale du Mali.

Elle a une population de 47.836 habitants (50,5% sont des femmes) distribué parmi 20000 ménages dans la ville de Dioro et les participants étaient suivis de façon prospective pendant 6 mois.

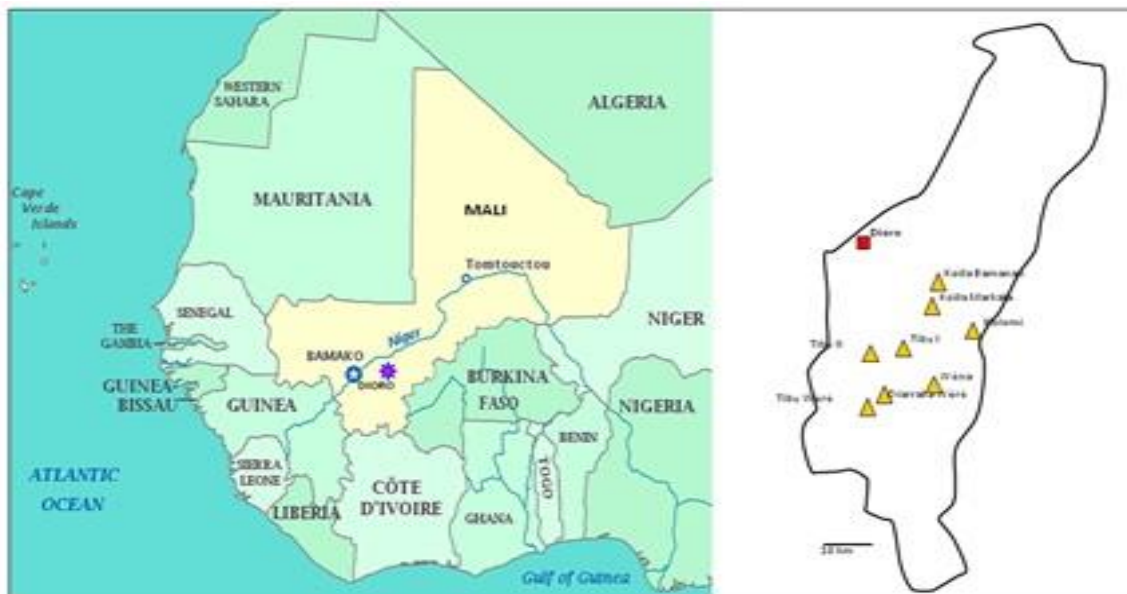


Figure III: Situation géographique de la commune rurale de Dioro au Mali

- **Présentation du Centre de Santé Communautaire de Dioro**

Le centre de santé communautaire (CSCoM) de Dioro est une structure sanitaire de niveau I de la pyramide sanitaire du Mali. Ce centre est situé sur la route principale Ségou-Dioro du côté-Est de la Mairie.

- **Organisation générale du CSCom de Dioro**

Dirigé par un Directeur Technique de Centre (DTC).

○ **Les locaux et le personnel :**

Le centre dispose :

- **Un dispensaire comprenant :**

Une (01) salle d'attente, un (01) bureau du médecin (médecin généraliste), un (01) bureau du major (une infirmière d'état), une (01) salle d'injection, une (01) salle de pansement (03 aides-soignants), un premier dépôt de médicaments (un gérant), une (01) toilette pour le médecin, un (01) laboratoire d'analyse biomédicale (un laborantin biologiste), une (01) unité de laboratoire de biologie moléculaire appliquée, qui a pour objectif d'appliquer le programme d'ICEMR (International Center of Excellence for Malaria Research), et un (01) magasin.

- **Une (01) maternité (nouvelle maternité) (01 infirmière obstétricienne et deux matrones),**

- **Un (01) bloc d'observation comprenant :**

Deux (02) salles d'observation, le bureau du président de l'ASACO, le bureau du trésorier de l'ASACO et un (01) deuxième dépôt de médicaments pour la garde.

- Un bloc (01) (ancienne maternité) comprenant :

- Une salle d'échographie (un médecin généraliste), le bureau de la mutuelle, une salle d'enregistrement de naissance et un dortoir pour l'ambulancier (un chauffeur).
- Un hangar pour la vaccination, un magasin pour la maternité et le dortoir pour le gardien.

• **Les activités du CSCom de Dioro**

- ✓ Les consultations sont effectuées du lundi au vendredi de 08h à 13h.
- ✓ Les gardes sont assurées après les heures de services.
- ✓ Il existe au niveau du dispensaire un site de prise en charge globale du VIH.
- ✓ un centre de diagnostic de la tuberculose (CDT).
- ✓ une unité chargée du dépistage et de la prise en charge des enfants présentant la malnutrition.
- ✓ Au niveau de la maternité il existe un site de protection de la transmission mère-enfant du VIH.

- ✓ Le gérant du dépôt de médicaments est chargé de la dispensation des molécules Antirétroviraux, la gestion des tickets de consultation et la vente des médicaments.

4.2. Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude cohorte prospective qui a été faite entre novembre 2015 et Mai 2016.

4.3. Population d'étude et échantillonnage

La population d'étude a concerné les nourrissons de six (06) mois choisis parmi une liste d'enfants fournie par la maternité. C'était un essai randomisé dont la tranche d'âge était comprise entre (06) mois et (06) mois plus 14 jours dont les parents étaient consentants pour participer à l'étude.

4.4. Eligibilité des participants

- **Critères d'inclusion**

Etaient inclus dans cette étude les nourrissons ayant :

- Six (06) mois au début de l'enrôlement ;
- N'ayant pas fait l'objet d'hospitalisation antérieur ;
- Un taux d'hémoglobine supérieur à 7 g/dl ;
- Une absence des parasites intestinaux et / ou du parasite du paludisme ;
- Les nourrissons dont les familles acceptent de les nourrir pendant 6 mois avec une dose quotidienne de son de riz stabilisé à la chaleur fournie par les investigateurs ;
- Les nourrissons n'ayant pas eu de vitamine A en capsule.

- **Critères d'exclusion**

Etaient exclus dans cette étude, les nourrissons ayant eu :

- Des épisodes diarrhéiques entre le 5ème et le 6ème mois d'âge ;
- Une hospitalisation antérieure ;
- Un traitement antibiotique dans un délai d'un (01) mois avant la participation ;

- **Critères de non-inclusion**

N'étaient pas inclus dans cette étude, les nourrissons ayant eu :

- Un traitement antipaludique ou prophylactique dans un délai de deux (02) semaines avant la participation
- Une maladie actuelle ;
- Une maladie chronique entraînant un état connu d'immuno-compromission ou un antécédent d'immunodépression;

- Un taux d'hémoglobine inférieur à 7 g/dl ;
- Des parasites intestinaux ;
- Des parasites du paludisme.

- **Critères de retrait au cours de l'étude**

Durant les six mois de suivi, le nourrisson était retiré de l'étude lorsque :

- Il ne pouvait pas consommer de façon quotidienne la supplémentation en son de riz ;
- Il développe une maladie qui exige une hospitalisation
- Les parents ne fournissent pas des échantillons ou ne remplissent pas les formulaires/questionnaires au cours des visites d'étude,
- Les parents se déplacent en dehors de la zone d'étude.

- **Randomisation et masquage**

Les membres de la famille des participants qui ont satisfait aux critères d'éligibilité ont complété le consentement éclairé (oral / écrit). Les participants ont été randomisés selon le sexe et l'emplacement géographique du ménage pour recevoir la vitamine A ou le son de riz et ont reçu un numéro d'identification de l'étude.

4.5. Interventions

4.5.1. Intervention diététique de supplémentation

La préparation du son de riz a été effectuée à l'USDA (United States Department of Agriculture) (Beaumont, TX) dans l'Etat de Colorado aux USA. Le son de riz a été stabilisé à 100 ° C pendant 10 minutes et préemballé par Western Innovations (Denver CO) en incréments de 1 g dans des sachets imperméables individuels de 2 "x 3". Warren Analytical Laboratories (Greeley, CO) a assuré que la supplémentation de son de riz était confirmée négative à *E. coli* et *Salmonella* et que les niveaux d'arsenic déterminés étaient sûrs.

A la visite préliminaire, tous les participants ont reçu une supplémentation de vitamine A (100.000 unités internationales). Puisque la vitamine A est stockée dans le foie, des suppléments de vitamine A de forte dose sont donnés seulement une fois tous les quatre à six mois pour empêcher le déficit de vitamine A chez les nourrissons (36).

Un approvisionnement d'une semaine en supplémentation de son de riz stabilisé à la chaleur était donné aux familles des participants pour tous les nourrissons randomisés dans le groupe de son de riz. La dose de son de riz pour le premier mois de l'étude était de 1 gramme. Le

personnel d'étude a fait des visites au quotidien dans les ménages des nourrissons pour vérifier l'observance et identifier tous les problèmes qui survenaient.

Les participants et leur parent dans le bras son de riz recevaient chaque semaine la quantité de couches (7 couches/semaines) et de son de riz nécessaire pour la consommation. La quantité de son de riz a augmenté de 2 g/jour au 2^{ème} mois, 3 g/jour au 3^{ème} mois et 4^{ème} mois, 4g au 5^{ème} mois et 5g au 6^{ème} mois de l'étude.

Des formulaires de report de cas ont été donnés pour estimer le nombre d'épisodes et la durée des diarrhées et les habitudes d'alimentation du nourrisson en sevrage.

Une autre fiche de formulaire de report de cas était remplie par l'agent de santé communautaire pour observer l'adhérence à la consommation du son de riz afin de calculer le taux de conformité de la dite consommation par les enfants. Pour les participants du bras témoin, aucun son de riz n'a été fourni durant l'étude. Ils étaient contactés chaque jour par l'agent de santé communautaire pour observer les épisodes de diarrhées et la survenue d'autres problèmes. En cas diarrhée et pendant les visites mensuelles les échantillons de selles fraîchement émises dans les couches culottes fournies par l'étude étaient au laboratoire pour collecte.

4.5.2. Techniques de laboratoire réalisées lors du suivi des nourrissons

Nous avons utilisé la technique de goutte épaisse qui est une technique microscopique permettant la détection morphologique du parasite et aussi bien la technique d'immuno-capture permettant la détection des antigènes plasmodiaux circulant dans le sang (Test de Diagnostic Rapide).

4.5.2.1. Diagnostic du paludisme par la méthode de la goutte épaisse:

La goutte épaisse est une technique d'observation au microscope d'un étalement sanguin, une fois séché, coloré et traité, cette goutte permet de mettre en évidence le parasite du paludisme dans les globules rouges.

- **Matériels et réactifs :**
 - Lames propres et emballées
 - Vaccinostyles stériles
 - Eau distillée et alcool 70°C
 - Coton hydrophile
 - Solution diluée à 10% de Giemsa

- **Mode opératoire**

- En tenant la main gauche du patient, paume vers le haut, prendre l'annulaire (ou le gros orteil pour le nourrisson);
- Nettoyer le doigt avec un coton imbibé d'alcool laisser sécher;
- D'un mouvement rapide, piquer la pulpe du doigt avec le vaccinostyle stérile
- Presser doucement le doigt afin d'extraire la première goutte de sang qu'il essuyer à l'aide d'un coton sec ;
- En agissant rapidement et en tenant les lames propres par les bords, presser le doigt et déposer au milieu de la lame une seule goutte de sang d'environ 5µl ;
- Tenir la lame par les bords et utiliser le coin d'une autre lame pour réaliser la goutte épaisse de la façon suivante : en faisant un mouvement centrifuge et circulaire, une couche épaisse et régulière d'environ 1 cm de diamètre ;
- Laisser sécher et colorer au Giemsa à 10% pendant 15 minutes ;
- Rincer à l'eau propre (P^H neutre) en évitant de perdre la goutte ;
- Les étalements ainsi colorés sont lus à l'aide du microscope électrique (Nikon, Japon) avec un grossissement 1000X sous huile à immersion (Resolve®).

Tous les patients ayant participé à l'étude devraient être confirmés négatifs au cours du recrutement.

Les techniques spectrophotométriques ont permis d'estimer le taux d'hémoglobine dans le sang.

4.5.2.2. Estimation du taux d'hémoglobine :

Il s'agissait de déterminer si le patient présente une anémie en estimant le taux d'hémoglobine (une des indications de l'hémolyse due à la destruction des hématies à la suite de leur infection par les parasites hématozoaires du paludisme et autres).

- **Matériels et réactifs :**

- Micro cuvettes réactives
- Vaccinostyles stériles
- Eau distillée et alcool 70°C
- Coton hydrophile
- HemoCue 201

- **Mode opératoire du spectrophotomètre (www.Hemocue.com)**

- En tenant la main gauche du patient, paume vers le haut, prendre l'annulaire (ou le gros orteil pour le nourrisson);
- Nettoyer le doigt avec un coton imbibé d'alcool laisser sécher;
- D'un mouvement rapide, piquer la pulpe du doigt avec le vaccinostyle stérile
- Presser doucement le doigt afin d'extraire la première goutte de sang qu'il essuyer à l'aide d'un coton sec ;
- Déposer une goutte de sang dans la cuvette réactive et introduire dans le HemoCue;
- Observer le résultat qui apparait sur l'écran et donnant la valeur du taux d'hémoglobine.

L'examen direct des selles et la technique de kato-katz nous permettaient de faire la mise en évidence des différents stades des parasites intestinaux.

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

4.5.2.3. Diagnostic des parasitoses intestinales par des examens de selles :

4.5.2.3.1. Examen direct :

L'examen direct permet de repérer les formes végétatives, vivantes, mobiles et kystes de protozoaires, les œufs et les larves d'helminthes, s'ils sont assez nombreux.

• Matériels et réactifs :

- Lames porte-objet
- Lamelles 20 x 20 mm
- Crayon gras ou marqueurs indélébiles
- Spatule (applicateurs en bois)
- Soluté physiologique: solution salé isotonique (0, 9% Na Cl)
- Solution de Lugol à 1% (1g d'iode, 2g d'iodure de potassium (KI) ,100 ml d'eau distillée.
- Pipette Pasteur
- Blouse
- Gants
- Poubelle
- Boite de pétri

- Microscope optique
- **Mode opératoire:**
 - Avec un crayon ou un marqueur indélébile écrire le numéro d'identification du patient et la date sur la partie dépolie de l'extrémité de la lame.
 - Déposer une goutte de soluté à l'aide d'une pipette Pasteur sur une autre lame, avec la spatule on y triture une petite portion de selles (approximativement 2 mg) de manière à obtenir une suspension.
 - Déposer une goutte de suspension obtenue au milieu de la moitié droite et gauche de la lame numérotée correspondant à l'échantillon. Ajouter dans une des gouttes de selles 1 goutte de Lugol et mélanger avec un applicateur.
 - Recouvrir chaque préparation d'une lamelle, afin d'éviter la formation des bulles d'air.
 - Examiner les préparations au microscope. Pour la préparation au soluté physiologique utiliser les objectifs 10 x et 40 x, réduire l'éclairage en fermant le condensateur.
 - Bien examiner tout le champ, en prenant un repère sur le bord de la préparation et ainsi de suite pour toute la lame. A l'examen le lugol colore en brun les vacuoles iodophiles et les noyaux des protozoaires.

4.5.2.3.2. Examen par la technique de Kato- Katz :

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

- **Matériel et réactifs :**
 - Lames porte-objet (75 x 25 mm)
 - Crayon gras ou marqueurs indélébiles
 - Spatule (applicateurs en bois)
 - Membrane de cellophane hydrophile découpée en rectangle de 5 cm x 2 cm
 - Tamis en mailles d'acier de 300-500 µm de diamètre
 - Calibreur
 - Papier hygiénique ou un tissu absorbant
 - Solution de vert de malachite-glycérol (1 ml d'une solution aqueuse de 3% de vert de malachite, ajouté à 100 ml de glycérol et 100 ml d'eau distillée. Les rectangles de cellophane sont trempés dans une des solutions pendant au moins vingt-quatre heures. Chambre humide (Bac contenant une couche de papier hygiénique humectée d'eau).

- **Mode opératoire :**

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

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

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

NB : Cette technique est à la fois qualitative et quantitative. Mais elle ne convient pas à l'examen des selles liquides dysentériques. En cas d'examen différé, les selles peuvent être conservées à 4°C pendant quelques jours. Au de-là de 2 heures de temps les œufs d'ankylostomes et de schistosomes deviennent difformes.

Pour les œufs des autres helminthes : *Ascaris*, *Necator*, *Tænia* etc. la préparation doit être immédiatement observée avant la déformation des éléments parasites ou leur détérioration.

Tous les sujets enrôlés étaient confirmés négatifs et les sujets positifs étaient traités sans être enrôler.

- **Plan de collecte et traitement des échantillons**

- **Echantillons de selles**

Il y a eu 7 séries de collectes d'échantillons de selles: à l'inclusion dans l'étude et durant les 6 visites mensuelles pour chaque participant.

- **Echantillons de sang**

Il y a eu un total de 7 collectes de sang pour les papiers confettis pour tous les participants. Il y a eu deux séries de collectes de sérum, il s'agissait de l'inclusion et la dernière visite de

l'étude. Ces sangs étaient prélevés au bout du doigt du nourrisson pour déterminer les biomarqueurs du dysfonctionnement entérique environnemental.

○ **Conservation des échantillons**

Lors des visites mensuelles et en cas de diarrhée, des selles fraîchement récoltées étaient diluées 20 fois et homogénéisées dans du sérum physiologique anaérobie pré-réduit stérile - 0,1 M tampon phosphate de potassium (pH 7,2) contenant 20% de glycérol (vol / vol). Le surnageant est distribué dans des cryotubes de 10ml et immédiatement transférés dans une bombonne d'azote liquide avant d'être acheminés au LBMA à Bamako pour être conservés dans un congélateur -80°C jusqu'à utilisation. Des échantillons de selles fraîchement émises ont été collectés dans de tube eppendorf et gardés à 4°C.

Le sang total collecté à l'inclusion et au 6ème mois de l'étude a été centrifugé et le sérum obtenu était conservé à -20°C. Les papiers confettis (sang séché sur du papier) ont été gardés dans un endroit sec.

○ **Détermination de la concentration des biomarqueurs**

Elle a été réalisée dans l'Etat de Colorado aux USA.

Des échantillons d'épisodes de diarrhée ont été recueillis selon le même protocole.

Les biomarqueurs ont été estimés pour signaler l'inflammation intestinale et l'intégrité épithéliale comme indicateurs de la DEE. Les échantillons de selles collectés au 6^{ème}, 8^{ème}, 10^{ème} et 12^{ème} mois ont été dilués et centrifugés à 3000 tr / min pour éliminer les débris. Le surnageant ainsi obtenu a été utilisé pour la détermination des concentrations de biomarqueurs de la DEE par la méthode ELISA. Les modes opératoires étaient réalisés conformément aux protocoles fournis par les kits. Les concentrations de CAL ont été déterminées à un facteur de dilution final 1:360 (Eagle Biosciences-Nashua, NH. Ref: CAL35-K01). Les échantillons ont été dilués à 1:100 pour la détermination des concentrations de NEO (GenWay Biotech Inc-San Diego, CA, États-Unis. Ref: 40-371-25012). Les concentrations de MPO ont été déterminées à un facteur de dilution de 1:500 (Immundiagnostik AG-Bensheim, Allemagne. Ref: K 6630). Les échantillons ont été dilués à 1:12 500 pour la détermination des concentrations d'AAT (Immuchrom GMBH-Heppenheim, Allemagne. Ref: IC6200). Les concentrations finales ont été déterminées à partir des moyennes des tests répétés et des lectures de densité optique en double. Les données étaient ensuite analysées à l'aide du logiciel Graphpad 6.0 selon les normes mesurées sur chaque plaque de 96 puits et incluent des instructions analytiques.

○ Mesure des paramètres anthropométriques

Il y a eu au moins deux mesures du périmètre brachial, au début et à la fin de l'intervention, (07) sept séries de mesures de la taille et du poids pour tous les participants, une mesure à chaque mois de l'étude, incluant celle faite à l'enrôlement. Ces mesures nous ont permis de calculer les z-scores (rapport poids-taille, poids-âge ou taille-âge) ce qui indique le profil général de la croissance, qui décrit les changements de la rapidité liés à l'âge et caractérise la croissance de l'Homme après la naissance. Nous avons mesuré la taille et le poids durant les épisodes de diarrhées.

4.6. Etude microbiologique

Les échantillons étaient décongelés avant d'être cultivés sur de la gélose Mac CONKEY et Hektoen pour l'isolement des *E. coli* *Shigella* et *Salmonella* pendant 24 à 48 heures d'incubation à 37 °C.

Des tests biochimiques étaient réalisés sur des colonies pures. Il s'agissait de : la gélose Kligler (glucose, lactose, gaz, H₂S), le milieu citrate Simmons, l'Urée-Indole, l'oxydase et le MR-VP.

4.7. Protocole de culture des selles

4.7.1. Gélose de Mac Conkey : BD Difco™

Principes :

- L'inhibition des microorganismes à Gram positif est due à la présence de sels biliaires et de cristal violet. Ce colorant inhibe principalement le développement des entérocoques et des staphylocoques.
- La fermentation du lactose en acide est révélée en présence de rouge neutre par la formation de colonies roses ou rouges.
- Les microorganismes lactose-négatif présentent des colonies incolores.

Préparation du milieu

- Mettre en suspension 50,0 g de milieu déshydraté (BD Difco™) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

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

NB: le milieu peut être additionné de MUG (4-méthyl-umbelliféryl- β -D-glucuronide) afin de détecter *Escherichia coli* (se référer à la monographie concernant le supplément MUG 50 mg, BS024).

Mode opératoire

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

Lecture :

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

4.7.2. Gélose Hektoen : BD DIFCO™

La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant les isolements et différenciation des entérobactéries pathogènes à partir des prélèvements biologiques d'origine animale, des eaux, des produits laitiers et des autres produits alimentaires. Elle est également utilisée dans le domaine de la santé animale dans le cadre de la recherche des salmonelles chez les mammifères. Ce milieu est particulièrement adapté à la culture des *Shigella*. Il évite l'envahissement par les *Proteus*.

Principes :

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

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

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

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

Préparation du milieu

- Mettre en suspension 75,1 g de milieu déshydraté (BD Difco™) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47°C.
- Couler en boîtes de Pétri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.

Mode opératoire

A la surface des boîtes ainsi préparées ramené préalablement à température ambiante, ensemer en stries l'inoculum, à partir des milieux d'enrichissement utilisés pour la recherche des *Salmonella* et *Shigella*.

Incuber à 37°C pendant 24 heures.

NOTE : Selon les normes appliquées, l'incubation peut être poursuivie jusqu'à 48 heures.

Lectures :

Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon", les autres donnant des colonies bleues ou vertes. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent, avec le citrate ferrique, des colonies à centre noir. L'aspect des microorganismes est le suivant :

Tableau II: Interprétation des caractères morphologiques des cultures sur Hektoen

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

4.7.3. Gélose de Kligler : BD BBL™ Kligler iron agar

Principes :

Les fermentations du lactose et du glucose, qui permettent la différenciation des entérobactéries, se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH).

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

La production d'H₂S se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

La production de gaz (H₂, CO₂), résultant des fermentations sucrées, se traduit par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

Préparation :

- Mettre en suspension 58,0 g de milieu déshydraté (BD BBL™) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Incliner les tubes de manière à obtenir un culot de 3 cm de hauteur et une pente oblique.

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

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

Mode opératoire

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

Lecture :

Le milieu de Kligler fournit quatre renseignements principaux

- **Fermentation du glucose**

Culot rouge : glucose non fermenté

Culot jaune : glucose fermenté

- **Fermentation du lactose**

Pente inclinée rouge : lactose non fermenté

Pente inclinée jaune : lactose fermenté

- **Production de gaz**

Apparition de bulles de gaz dans le culot

- **Formation d'H₂S**

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

4.7.4. Citrate de Simmons OXOID CM0155

Milieu gélosé pour l'identification des entérobactéries par l'utilisation du citrate comme seule source de carbone.

Tableau III : Composition du milieu citrate de Simmons

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

500 grammes permettent de préparer 21,5 litres de milieu.

Préparation :

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

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

L'addition de bleu de bromothymol dans le milieu l'a nettement amélioré.

La gélose citrate de Simmons est conforme aux recommandations de l'APHA.

Utilisation

Ce milieu peut être utilisé aussi bien en tube gélosé incliné qu'en boîte de Pétri. Dans les deux cas, ensemercer légèrement la surface du milieu par stries et pour les tubes en pente jusque dans le culot. Il est recommandé d'incuber 48 heures à 37°C. L'utilisation du citrate entraîne une alcalinisation (+) avec un virage du milieu du vert au bleu brillant. Dans le cas contraire, il n'y a pas de changement de couleur. *Escherichia coli* (y compris les sérotypes responsables d'entérites infantiles), *Shigella*, *Yersinia* et *Edwardsiella* ne poussent pas sur ce milieu. *Serratia*, la plupart des *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Providentia*, (sauf *Morganella morganii* et *Klebsiella rhinoscleromatis*) utilisent le citrate et donnent une teinte bleue caractéristique.³ La gélose citratée de Simmons peut servir à différencier *Salmonella enteritidis* et les *Salmonella* appartenant aux espèces II, III et IV qui sont citrate (+) de *Salmonella typhi*, *paratyphi A*, *pullorum* et *gallinarum* qui sont citrate (-).

Conservation

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

Conserver le milieu prêt à l'emploi à 2–8°C.

4.7.5. Le milieu urée-indole

Intérêt

Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants :

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

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

Tableau IV: Composition du milieu synthétique

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

Principe

Recherche de l'uréase

L'uréase dégrade l'urée selon la réaction suivante : $\text{Urée} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$ Les ions CO_3^{2-} vont entraîner une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rouge).

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

La tryptophanase hydrolyse le tryptophane selon la réaction suivante : $\text{Tryptophane} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{indole} + \text{acide pyruvique} + \text{NH}_3$ L'indole forme un complexe coloré en rouge en présence d'un réactif : le réactif de Kovac.

Recherche du tryptophane désaminase

La TDA dégrade le tryptophane selon la réaction suivante : $\text{Tryptophane} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acide indole pyruvique} + \text{NH}_3$ L'acide indole pyruvique forme un précipité marron foncé en présence d'un réactif : le chlorure de fer en solution acide.

Ensemencement

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

Incubation 24 heures à 37°.

Réactifs

- Réactif de Kovacs (Réf. 55 631)
- Réactif ID Indole TDA (Réf. 56 541)

Matériels

- Etuve bactériologique
- Pipettes graduées
- Tubes à hémolyse

Mode opératoire

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

Le choix de la température d'incubation est de la responsabilité de l'utilisateur en fonction de

- l'application et des normes en vigueur.

Lecture

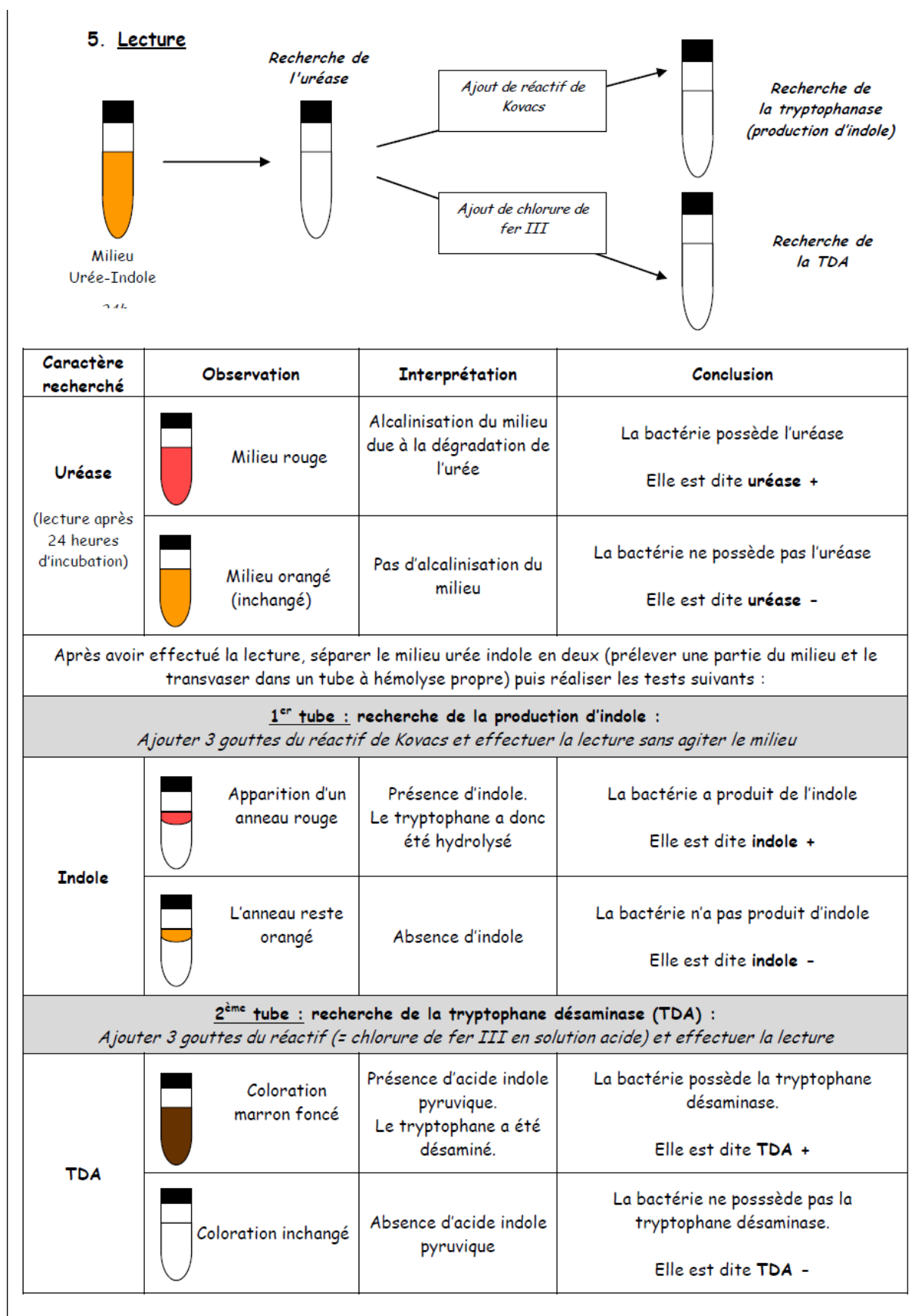


Figure IV: Lecture et interprétation des tests biochimiques

- Indole TDA (Réf. 56 541)

4.7.6. MR-VP Medium (Glucose Phosphate Broth) OXOID CM0043

- Il est recommandé pour la performance du Rouge de méthyle et de Voges-Proskauer test dans la différenciation du groupe coli-aérogène.

Préparation :

Formule ajustée, normalisée en fonction des paramètres de performance instructions Suspendre 17 grammes dans 1000 ml d'eau distillée. Chauffer si nécessaire pour dissoudre le moyen complètement. Distribuer dans des tubes à essai dans des quantités de 10 ml et stériliser par autoclavage à (121°C) pendant 15 minutes.

Principe et interprétation :

Le Rouge de méthyle et le test de Voges-Proskauer sont parmi les deux différents tests utilisés dans l'identification biochimique des bactéries espèce. Ces essais ont été initialement étudiés par Voges-Proskauer, puis par Clark et Lubs pour différencier entre les membres du groupe aérogènes coliformes. Les deux tests sont basés sur la détection des produits de dégradation spécifiques dans le métabolisme des glucides.

Tous les membres des entérobactéries sont, par définition, fermenteurs de glucose.

Dans MR-VP Broth, après 18-24 heures d'incubation fermentation produit des sous-produits métaboliques acides.

Par conséquent, d'abord tous les entériques donneront une réaction MR positive si testée. Cependant, après une incubation supplémentaire, requis par la procédure de test (2-5 jours), MR- organismes positifs continuent à produire les acides, ayant pour résultat un pH faible (acide) qui surmonte le système tampon phosphate et maintient un environnement acide dans le milieu (pH 4,2 ou moins). MR-organismes métabolisent négatifs en outre les produits de fermentation initiale par décarboxylation pour produire neutre methylcarbinol d'acétyle (acétoïne), ce qui entraîne une diminution de l'acidité du milieu et augmente le pH vers la neutralité (pH de 6,0 ou au-dessus).

En présence d'oxygène atmosphérique et alcalin, les produits terminaux neutres, acétoïne et 2, 3-butanediol, sont oxydés en diacétyl, qui réagissent avec la créatine pour produire une couleur rouge.

Le (MR) de test de rouge de méthyle est effectuée après 5 jours d'incubation à 30 ° C. Pour le test de Voges-Proskauer (VP) les cultures sont mises en incubation à 30 ° C pendant 24-48 heures. Les tests MR et VP ne devraient pas être considérées comme le seul moyen de différencier *E. coli* du *Klebsiella* et d'*Enterobacter*.

4.8. Etude moléculaire

Nous avons utilisé la technique moléculaire PCR pour la détection des souches pathogènes d'*E.coli* dans les souches isolées soupçonnées d'être *E.coli* par la méthode microbiologique.

• La Polymerase Chain Reaction (PCR)

C'est une technique de biologie moléculaire basée sur la sélection puis l'amplification d'un gène spécifique de la bactérie à partir d'amorces spécifiques à ce gène.

Elle permet l'amplification exponentielle d'une région spécifique d'un acide nucléique donné par l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, d'amorces et quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs).

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

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

○ Extraction de l'ADN

L'ADN des colonies de bactéries identifiées comme *E. coli* a été extrait par la technique du choc thermique.

Des colonies étaient suspendues dans 100 µl d'eau distillée et incubées à 100°C pendant 10 minutes dans le Bain Marie (Isotemp 2100, Fisher Scientific).

Après le choc thermique, la suspension est centrifugée à 2500 g à 25°C (Eppendorf 5417R, Hambourg, Allemagne) pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite recueilli dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, si la PCR n'était pas réalisée toute de suite il était gardé à -20°C en vue des études moléculaires.

La qualité de l'ADN extrait et sa concentration ont été déterminées par la lecture de la densité optique au spectrophotomètre (Eppendorf Biophotometer, Hambourg, Allemagne).

○ **Amplification par la PCR de l'ARNr 16s pour l'identification bactérienne**

Cette amplification avait pour but de confirmer la présence de bactéries dans les échantillons de selles soupçonnés d'être *E.coli* par la méthode microbiologique.

Pour cela nous avons utilisé les réactifs MyFi™ de Bioline (Meridian Life Science) avec les amorces universelles 16S rDNA (Univ-0008-a-S-19F et Univ-1528-a-A-17r) à une concentration de 10µM.

Tableau V: Mélange réactionnel pour l'amplification de l'ARNr 16S par PCR

ADN	200 ng (1µl)
5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	1µl
5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'	1µl
Master Mix MyFi, 2X	25 µl
H ₂ O ultra pure	22 µl

Tableau VI: Le programme d'amplification de l'ARNr 16S par PCR

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 minute	1
Dénaturation	95°C	15 secondes	35
Appariement	60°C	15 secondes	
Elongation	72°C	15 secondes	
Incubation à 4°C	4°C	∞	

Les produits de la PCR étaient réalisés sur un gel d'agarose (Bio- Rad Laboratory, Spain) à 2% contenant du bromure Ethidium 0,5X avec les marqueurs de tailles moléculaires 100 paires de base (**Réf : 11 721 933 001, version 07**).

La migration a été faite à 100 volts pendant 75 minutes. Les bandes étaient visualisées et photographiées sous UV light transilluminator (Fisher).

La taille des bandes était calculée à l'aide du logiciel Doc-ItLS Analysis Software (UVP, LLC 2066 W. 11th Street Upland, CA 91786)

Voir la procédure de la technique d'électrophorèse et visualisation des bandes amplifiées en annexe.

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

- **Etude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de la séquence codant le gène 16S**

La technique PCR-RFLP est l'association entre les techniques d'amplification d'un gène par PCR et d'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restriction nous permettant d'obtenir des haplotypes.

- **Les haplotypes**

On appelle haplotype une combinaison des profils de restriction obtenus par digestion avec les enzymes de restriction ici (*AluI*, *EcoRI* et *HaeIII*) possible pour un ensemble d'individus (population ou sous-population). Il apparaît alors au sein des populations des sous-ensembles d'individus ayant les mêmes profils de restriction pour les trois (03) enzymes. Ils forment des haplotypes. Pour chaque individu, trois (03) profils de restriction sont obtenus (profils de restriction provenant de la digestion par *AluI*, *EcoRI* et *HaeIII* chez un individu). On peut alors retrouver son haplotype par la combinaison des profils de restriction obtenus par la digestion avec les trois (03) enzymes.

- **Procédure de la digestion :**

Pour chaque enzyme, les réactifs ont été mélangés selon le tableau ci-dessous (Promega, Woods Hollow Road, Madison, Wisconsin, USA). Les enzymes utilisées sont :

Alu I, *EcoR I*, *Hae III*.

Tableau VII: Mélange réactionnel pour la digestion enzymatique

Réactifs	Volume (µl)
H ₂ O stérile	16,3
Tampon de Restriction, 10X	2
BSA acétylé, 10µg/µl	0,2
Amplicons du gène codant pour l'ARNr 16S, 1µg/µl	1
Enzyme de Restriction 10 unités/µl	0,5
Volume final	20

Le mélange est centrifugé et incubé à 37°C dans le thermo cycler PTC 200 (MJ Research, MD, USA) pendant 4 heures. Avant de procéder à l'analyse des fragments de restriction par électrophorèse sur gel d'agarose, 4 µl de tampon de charge (Promega, Madison, Wisconsin, USA) sont ajoutés au produit de la digestion.

- **Electrophorèse et visualisation des fragments : (voir mode opératoire en annexe 9.5)**

Un gel d'agarose à 2% (2g dans 100 ml de 0,5 X TBE) était préparé pour permettre la séparation des produits digérés par chacune des 3 enzymes de restriction. Les bandes rendues fluorescentes par le bromure d'éthidium (0,3µg/ml d'agarose) ont été photographiées sous la lumière Ultra-Violette du Trans illuminateur (Fisher Scientific) ensuite l'image du gel était téléchargée à l'aide de la camera du système EDAS 290 (Kodak 1D, version 3.5). La taille des fragments de clivage est estimée par le programme Kodak 1D (EDAS 290) en présence des marqueurs de taille (100 paires de bases, Sigma Aldrich) comme standard. Nous avons utilisé la règle de $n - 1$ pour estimer le nombre de sites de restriction par enzyme.

- **Amplification par les amorces spécifiques pour la détection des souches pathogènes d'*E.coli***

Les huit (08) paires d'amorces utilisées pour cette PCR correspondaient aux cinq (05) souches pathogènes d'*E.coli* recherchées. Là, nous avons encore utilisé le master mix MyFi™ qui est conçue avec une taq polymérase de forte fidélité (www.bioline.com), pré-préparé mis sur le

marché par la compagnie Bioline (Meridian Life Science) pour la réalisation de notre PCR. Le tableau suivant nous montre la liste des amorces utilisées à cet effet.

Tableau VIII:Listes des amorces utilisées (37)

Type de pathovars	Gène cible	Amorce	Séquences d'amorces (5'→3'), (3'→5')	taille du fragment en bp
ETEC	eltB	LT	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322
			CCATACTGATTGCCGCAAT	
	estA	ST	GTCAAACCAGTA (G / A) GTCTTCAAAA	147
			CCCGGTACA (G / A) GAGGATTACAACA	
EHEC	vt1	VT1	GAAGAGTCCGTGGGATTAC	130
			AGCGATGCAGCTATTAATAA	
	vt2	VT2	ACCGTTTTTCAGATTTT (G / A) CACATA	298
			TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT	
EPEC	eaeA	Eae	CACACGAATAAACTGACTAAAATG	376
			AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT	
	bfpA	bfpA	TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT	367
			TTTTGTTTGTGTATCTTTGTAA	
EIEC	ial	SHIG	CTGGTAGGTATGGTGAGG	320
			CCAGGCCAACAATTATTTCC	
EAEC	pCVD432	EA	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630
			AAATGTATAGAAATCCGCTGTT	

Tableau IX: Composition du mélange réactionnel pour la PCR multiplexe

C. initiale	Réactifs	Volumes	C. finale
-	Eau pure	3,5µl	-
10µM	ST-F	(0,5 µl)	1 µM
10µM	ST-R	(0,5 µl)	1 µM
10µM	LT-F	(0,5 µl)	1 µM
10µM	LT-R	(0,5 µl)	1 µM
10µM	VT1-F	(0,5 µl)	1 µM
10µM	VT1-R	(0,5 µl)	1 µM
10µM	VT2-F	(0,5 µl)	1 µM
10µM	VT2-R	(0,5 µl)	1 µM
10µM	EA-F	(0,5 µl)	1 µM
10µM	EA-R	(0,5 µl)	1 µM
10µM	SHIG-F	(0,5 µl)	1 µM
10µM	SHIG-R	(0,5 µl)	1 µM
10µM	BfpA-F	(0,5 µl)	1 µM
10µM	BfpA-R	(0,5 µl)	1 µM
10µM	Eae-F	(0,5 µl)	1 µM
10µM	Eae-R	(0,5 µl)	1 µM
-	MyFi™ (buffer, Mgcl2, dNTPs, taq)	12,5	-
-	ADN	1 µl	-
TOTAL	-	25µl	-

Le volume réactionnel final du mélange est de 24 µl aux quels seront ajoutés 1 µl d'extraits d'ADN soit un volume final de 25µl. Ensuite l'amplification enzymatique s'effectuera dans un thermo cycler de type Applied Biosystem en fonction du programme suivant (tableau 7).

Tableau X: programme de l'amplification par PCR

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	5 min	1
Dénaturation	94°C	1 min	30
Appariement	57°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation final	72°C	10 min	1
Incubation à 4°C	4°C	∞	

Les produits de la PCR étaient réalisés sur un gel d'agarose (Bio- Rad Laboratory, Spain) à 2% contenant du bromure Ethidium 0,5X avec les marqueurs de tailles moléculaires 100 paires de base (**Réf : 11 721 933 001, version 07**).

La migration a été faite à 100 volts pendant 75 minutes. Les bandes étaient visualisées et photographiées sous UV light transilluminator (Fisher).

La taille des bandes était calculée à l'aide du logiciel Doc-ItLS Analysis Software (UVP, LLC 2066 W. 11th Street Upland, CA 91786)

4.9. Procédure de la technique d'électrophorèse et visualisation des bandes amplifiées

4.9.1. Technique d'électrophorèse

• Matériels et réactifs

- Générateur,
- Appareil à photographie d'image digitale UVP avec un programme d'analyse,
- Cuve de migration,
- Pipettes et embouts,
- Agarose (2%) ; TBE (0,5X) ; Bac et peigne pour gel, Bromure d'éthidium (0,3µg/ml),
- Dye, Markers VI et Markers 100 bp, Amplicons, le contrôle positif et négatif.

- **Mode opératoire**

- Préparer une solution d'agarose à 2% de TBE 0,5x au four micro-onde pendant environ 1,30mn ;
- Ajouter 30µl de bromure d'éthidium, mélanger puis mouler dans un bac monté d'un peigne sur une surface plane bien ajustée, laisser le gel se polymériser pendant environ 30mn à 1 heure ;
- Placer le gel dans le bac à électrophorèse submergé d'une solution de TBE 0,5x. Loger les échantillons à tester et les contrôles en mélangeant 13µl d'ADN et 2µl de Dye dans les puits du gel en commençant par le marker VI (DNA Molecular Weight Marker VI, Roche, Allemagne) ou le marker 100 bp.
- Faire migrer du pôle moins (-) vers le pôle plus (+) pendant environ 90mn à 100 volts et à 2 ampères ;
- Révéler les bandes en scannant le gel à l'aide de l'appareil photo UVP relié à l'ordinateur, sauvegarder le fichier et analyser les paramètres moléculaires.

4.10. Visualisation des bandes amplifiées :

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

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

4.11. Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole a été soumis au comité Éthique de l'INRSP (Institut National de Recherche en Santé Publique) relevant du Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique, Mali. Le consentement a été obtenu de chaque mère ou tuteur du nourrisson comme indiqué dans la loi portant sur le code des personnes et de la famille.

Le son de riz a été donné à chaque nourrisson de l'étude avec l'aliment de choix du parent ou tuteur pour faciliter son absorption et une compensation de 1000 f CFA a été donné à chaque parent pour le temps perdu pendant la visite de suivi.

Tout changement ultérieur du protocole était soumis à l'approbation du comité d'éthique de l'INRSP. C'est une étude à risque minimal car il ne s'agit pas de tester un nouveau médicament ou un matériel à usage biomédical mais un supplément alimentaire. Elle s'appuie sur des tests de diagnostic (gouttes épaisses, examen de selles, HemoCue) qui sont utilisés en routine dans le centre de santé de Doro dans lequel nous avons conduit cette étude. Mais il y a des problèmes liés à l'âge de nos sujets, le suivi quotidien des nourrissons et la quantité de sang prélevé (sang capillaire et non veineux) qui d'ailleurs n'excède pas le volume recommandé. Il faudra noter que le volume total proposé (2,00 ml) pendant les 6 mois de l'étude se trouve dans l'intervalle des quantités admises par le NIH et autres agences, lesquelles sont $\leq 3,0$ ml par kg dans un intervalle de temps ≥ 8 semaines

Les noms des sujets n'ont jamais été associés à leur numéro d'identification. Tous les patients qui se sont révélés positifs par la goutte épaisse ont été traités selon le schéma de traitement du paludisme simple du Programme National de Lutte contre le paludisme (Ministère de la santé).

Les sujets présentant une parasitose intestinale au cours du screening ont été aussi traités mais n'ont pas été enrôlés conformément aux critères de non inclusions. Il faut noter qu'aucun nourrisson ne présentait un taux d'hémoglobine inférieur à 7g /dl.

4.12. Gestion des données

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

L'analyse des données a été faite pour la normalisation par **ENA for SMART**, puis transportées vers **IBM SPSS Statistics 20** et **EPI INFO.6** pour les analyses complémentaires.

Les analyses moléculaires ont été faites avec le logiciel de bio-informatique **Geneious 10.0.7**.

RESULTATS

5. Résultats

5.1. Facteurs démographiques

Notre étude a porté sur les enfants (garçons et filles) de 6 mois à 6mois plus 14 jours maximum, tous de la localité de Dioro.

Tableau XI: Répartition des enfants enrôlés en fonction du genre.

Genre	Effectifs	Pourcentage
Masculin	25	50
Féminin	25	50
Total	50	100,0

Au total 50 enfants ont participé à cette étude avec une répartition équilibrée entre le genre féminin et masculin.

Tableau XII: Répartition de la consommation mensuelle en fonction de la tolérance et de la conformité du son de riz stabilisé à la chaleur.

Mois	Consommation/g	Taux de consommation %
7 Mois	1	99,55
8 Mois	2	99,93
9 Mois	3	99,81
10 Mois	3	99,67
11 Mois	4	99,98
12 Mois	5	100

Au cours de cette étude, aucun participant ne s'est retiré du fait de la tolérance ou des réactions indésirables au son de riz.

Le taux de consommation de son de riz a été élevé durant les six (06) mois de l'étude, en partie grâce aux visites quotidiennes des agents de santé communautaire.

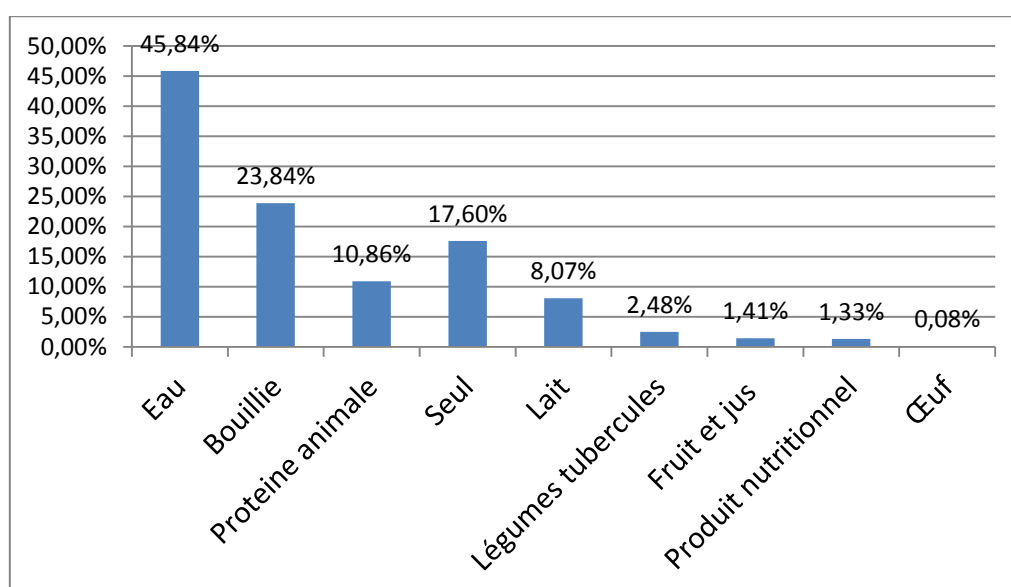
Le groupe témoin comme son nom l'indique n'a pas consommé du son de riz.

Tableau XIII: Répartition des épisodes diarrhéiques par groupe d'étude.

Mois / groupe	Son de riz	Témoin	total
7 Mois	1	5	6
8 Mois	2	1	3
9 Mois	2	6	8
10 Mois	1	4	5
11 Mois	1	3	4
12 Mois	0	0	0
total	7	19	26

Un total de 26 épisodes diarrhéiques a été observé pendant les 6 mois d'étude. Nous avons observé sept (7) épisodes de diarrhée dans le groupe son de riz soit 26,92% (7/26) chez (06) enfants avec un seul cas d'épisode répétitif et dix-neuf (19) épisodes de diarrhée dans le groupe témoin soit 73,08% (19/26) chez (12) enfants faisant entre (01) et (04) épisodes répétitifs de diarrhée.

Lors de la collecte de données sur la quantité de son de riz attribué, les agents de santé ont également recueilli des informations sur le type de nourriture avec laquelle le son a été consommé.

**Figure V: Consommation du son de riz avec les aliments divers.**

Comme l'indique la figure 8 près de 46% des mères mélangeait le son de riz simplement avec de l'eau, et 17% ont directement donné la poudre du son de riz aux nourrissons.

On constate que la bouillie (habituellement le millet, le sorgho ou le riz) est un aliment de base et sur le long du fleuve Niger le poisson constitue une grande partie de l'alimentation.

La poudre de lait est également disponible, et les familles mangent régulièrement la soupe d'arachide. Dans l'ensemble, nous pouvons voir que le son de riz est un complément polyvalent à un large éventail de types d'aliments.

Les figures ci-dessous montrent la différence de croissance des deux bras de l'étude en tenant compte des Z-scores.

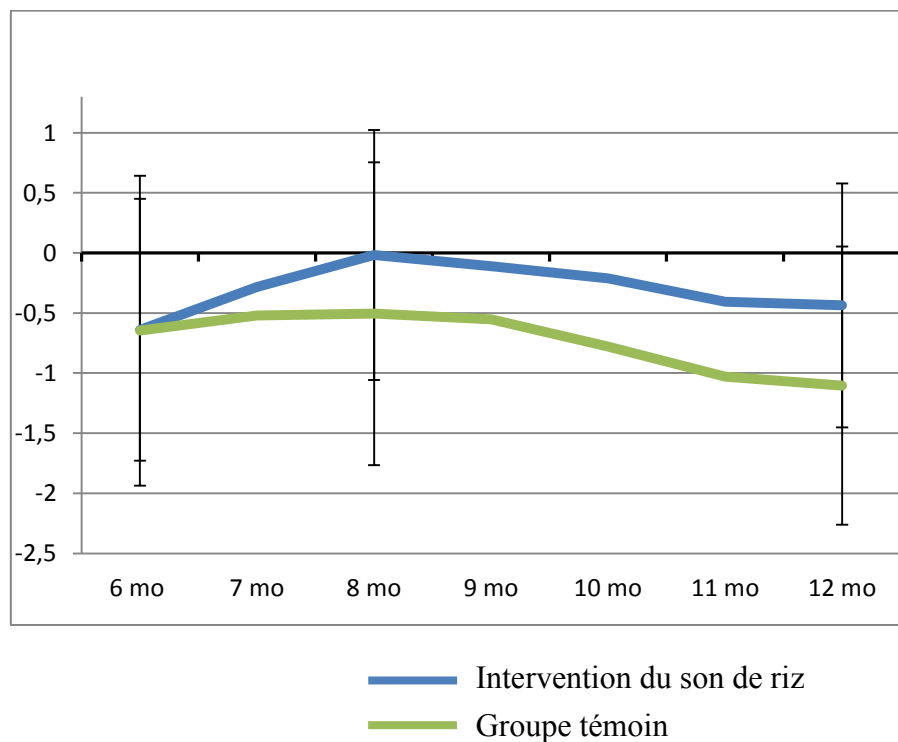


Figure VI: Poids-pour-Age Z-Score

Les Z-scores étaient plus élevés chez les enfants qui ont reçu le son de riz par rapport à ceux ne l'ayant pas reçu.

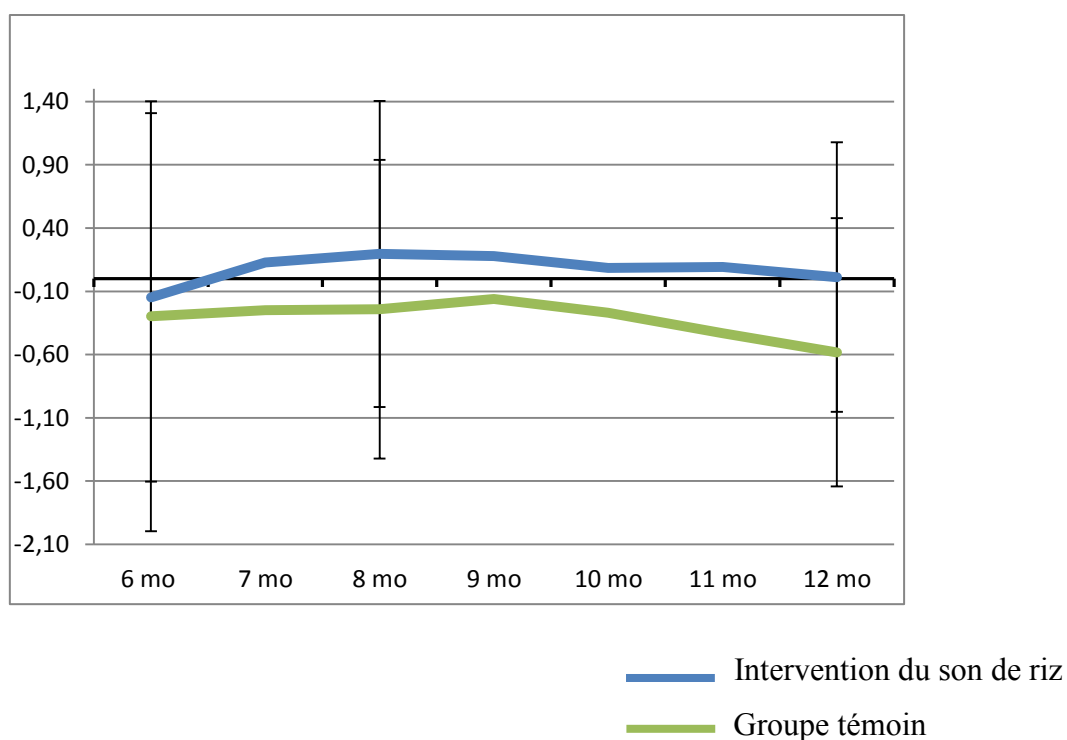


Figure : VII Taille-pour-Age Z-Score

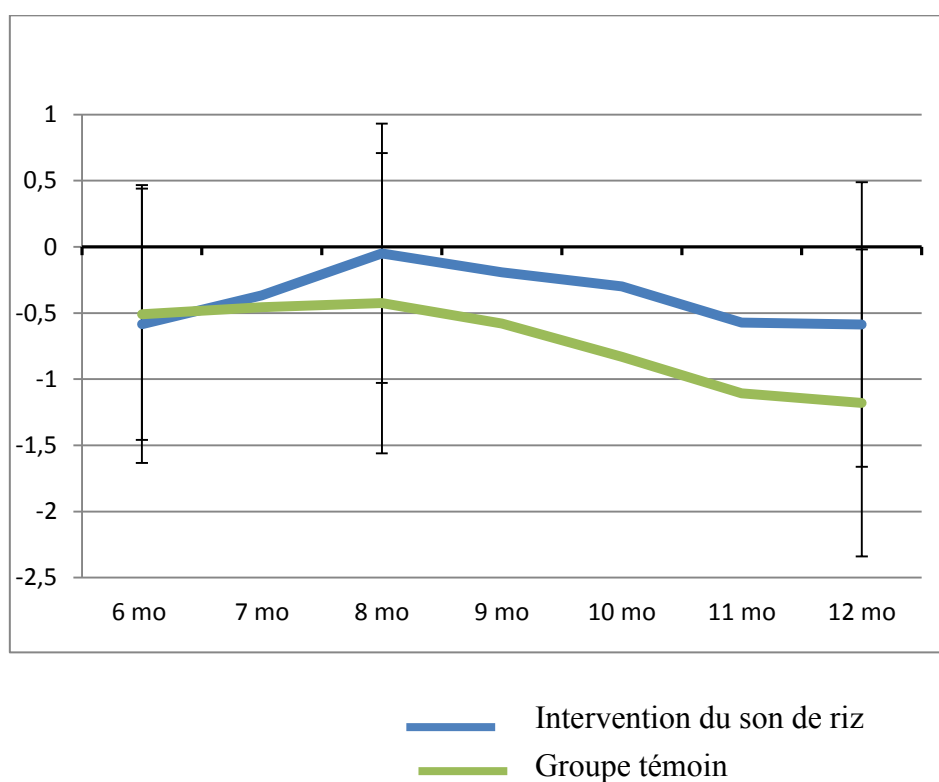


Figure VIII: Poids-pour-taille Z-Score

En utilisant les calculs anthropométriques pour les Z-Scores, comme recommande l'OMS où 0 représente la moyenne mondiale saine, nous avons déterminé que le groupe de son de riz a

marqué environ 0,6 points de plus pour tous les Z-scores que le groupe témoin à la fin de l'étude.

Nous avons inclus les écarts-types pour seulement 6,8 et 12 mois, mais la figure montre qu'il y avait un large éventail de scores entre les groupes. Nous avons remarqué que les bébés deviennent plus mobiles et sont susceptibles de consommer une plus grande variété d'aliments et de liquides à partir d'environ 8 mois, l'incidence de la diarrhée a augmenté dans les deux groupes. Les épisodes répétés de diarrhée étaient également beaucoup plus fréquents dans le groupe témoin.

Nous pouvons dire que jusqu'à 5 grammes de son de riz quotidien sont tolérables au sevrage des nourrissons maliens (Dioro). Nous avons également constaté que l'incidence des maladies diarrhéiques diminue, que les résultats de la croissance s'améliorent avec l'ajout de son de riz dans l'alimentation quotidienne.

Maintenant que nous savons que la maladie diarrhéique peut être diminuée et que la croissance est améliorée par le son de riz, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action dans l'intestin.

En collaboration avec l'université de Colorado qui a accordé une attention accrue à l'identification des biomarqueurs de la DEE dans les selles, nous avons procédé par des tests immuno-enzymatiques.

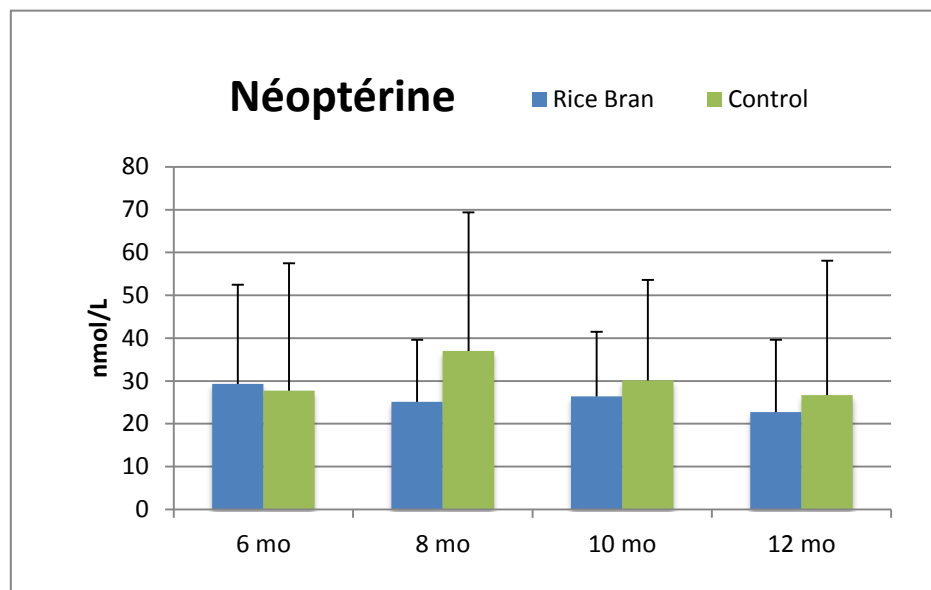
Les résultats des tests immuno-enzymatiques (ELISA) révèlent la présence de la calprotectine, la néoptérine et la myéloperoxydase qui sont des indicateurs de l'inflammation et l'alpha-1-antitrypsine qui est un indicateur de la perméabilité de l'intestin et du transfert de protéines de la circulation sanguine dans la lumière grâce à des jonctions étanches.

Tableau XIV : Les concentrations médianes des biomarqueurs du dysfonctionnement entérique environnemental(DEE) dans les selles mesurées aux 6^{ème}, 8^{ème}, 10^{ème} et 12^{ème} mois.

Biomarqueurs DEE	Groupe témoin	Groupe son de riz	P Value	Valeur normale (3 mois à 1 an
Néoptérine (nmol/L)				400-2500 nmol/mmol
6 mo	20,16(31.05)	34,63(28.04)	0,288263	
8 mo	36,16(27.56)	28,87(28.50)	0,348132	
10 mo	35,78(31.02)	35,34(30.19)	0,365738	
12 mo	12,05(33.03)	35,99(32.59)	0,662642	
Myéloperoxydase (ng/ml)				
6 mo	3970,63(17776.57)	5400,89(20794.76)	0.439382	
8 mo	15838.66 (20511.95)	7451,04(12972.74)	0.282504	
10 mo	5635,91(10143.96)	4115,83 (8255.26)	0.332892	
12 mo	4846,36 (11266.87)	3153,91(14095.22)	0.599026	
Calprotectine (µg/g)				50µg/g-250µg/g
6 mo	51,74(101.21)	53,34(106.38)	0.0640*	
8 mo	130,00(769.75)	68,73(126.78)	0.572783	
10 mo	39,06 (64.40)	68,98(119.90)	0.213093	
12 mo	35,03(70.25)	20,86(55.98)	0.812459	
Alpha-1 Antitrypsine (ng/ml)				0,78-2,0g/l
6 mo	247,48 (499.61)	463,1524 (891.77)	0.0999*	
8 mo	619,22 (759.03)	579,9188 (899.88)	0.489717	
10 mo	549,87 (841.04)	468,8996 (819.56)	0.856452	
12 mo	663,66 (580.55)	453,2198 (807.46)	0.31208	

Les concentrations moyennes de MPO, NEO, CAL et AAT n'étaient pas significativement différentes du point de vue statistique entre les groupes de 6, 8, 10 ou 12 mois.

Les concentrations médianes de tous les biomarqueurs fécaux étaient légèrement inférieures dans le groupe témoin que le groupe son de riz au départ, et les concentrations d'AAT et de CAL étaient significativement plus élevées dans le groupe son de riz à l'enrôlement $p = 0,09$.



Rice bran : son de riz

Figure IX: Résultat de biomarqueur néoptérine responsable de l'inflammation intestinale.

A part le 6^{ème} mois, la Néoptérine était plus présente chez les enfants du groupe contrôle par rapport au groupe son de riz ce qui peut s'expliquer par la fréquence plus élevée de cas de diarrhée dans ce groupe contrôle.

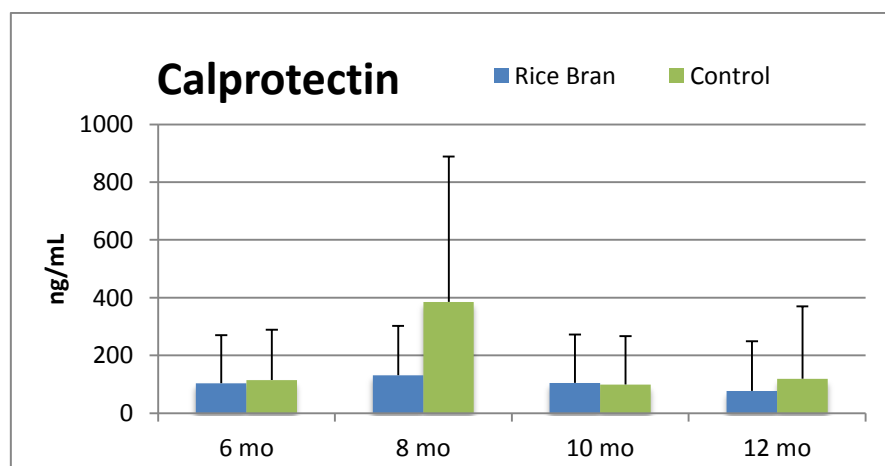


Figure X: Résultat de biomarqueur calprotectine responsable de l'inflammation intestinale.

Le biomarqueur calprotectine était en quantité plus réduite chez les enfants du groupe son de riz par rapport au groupe témoin.

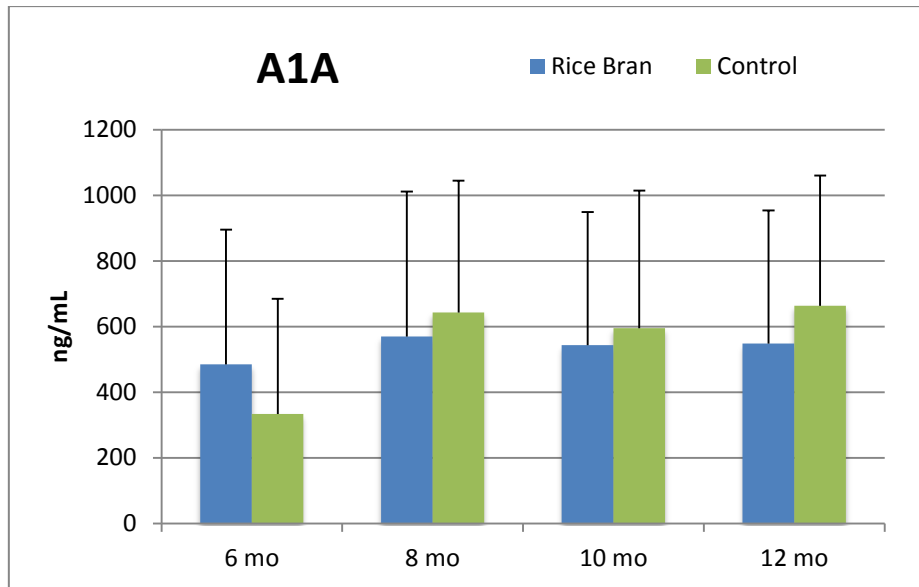


Figure XI: Résultat de biomarqueur Alpha-1-Antitrypsine responsable de la perméabilité intestinale et du transfert de protéines dans la circulation sanguine.

L'Alpha-1-Antitrypsine était plus présente dans le groupe témoin que le groupe son de riz sauf au moment de l'inclusion dans l'étude mais la différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,489717$).

- **Examen de l'implication d'*Escherichia coli* dans les selles diarrhéiques**
 - **Identification microbiologique**

Le tableau suivant nous montre les résultats des tests biochimiques.

Tableau XV : Résultats de tests biochimiques

Echan	Fermentation		Production						Présomption d'identification
	Glucose	Lactose	Gaz	H2S	Citrate	Urée	Indole	Oxydase	<i>E.coli</i>
0214	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0214	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0214	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0214	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0104	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0108	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0116	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0118	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0117	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0124	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0205	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0206	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0211	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0212	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0218	+	-	+	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
0222	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>
O157	+	-	+/-	-	-	-	+	-	<i>E.coli</i>

- **Recherche d'*E.coli* pathogène par PCR**

Nous avons utilisé la technique PCR avec les amorces universelles 16S rDNA (Univ-0008-a-S-19F et Univ-1528-a-A-17r) pour confirmer qu'il s'agissait bien des bactéries avant de faire la PCR multiplexe pour la pathogénicité.

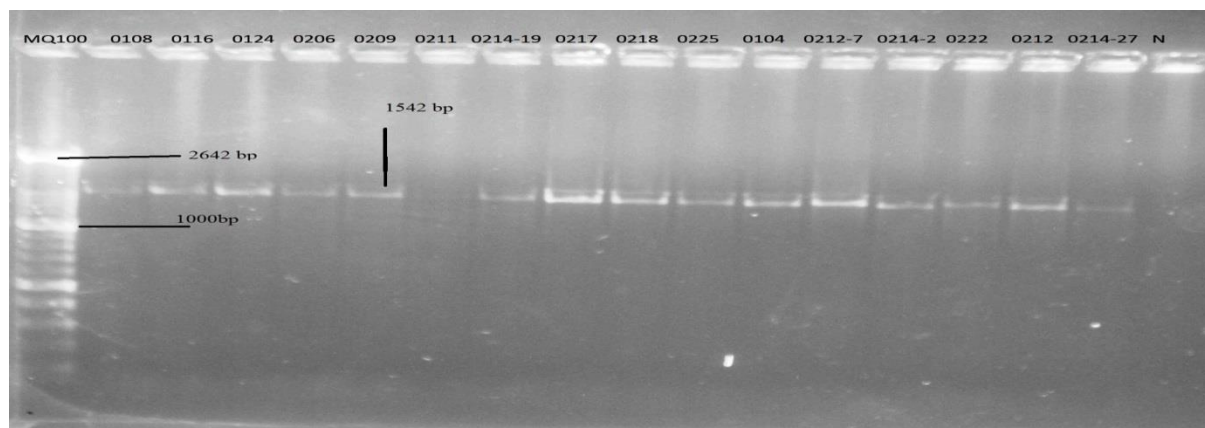


Figure XII : Taille des amplicons de l'ARNr 16S

L'amplification par l'ARNr 16S nous donne des bandes d'environ 1600 paires de base.

M : marqueur XIV 100pb.

Etude du polymorphisme des souches d'*E.coli* isolées.

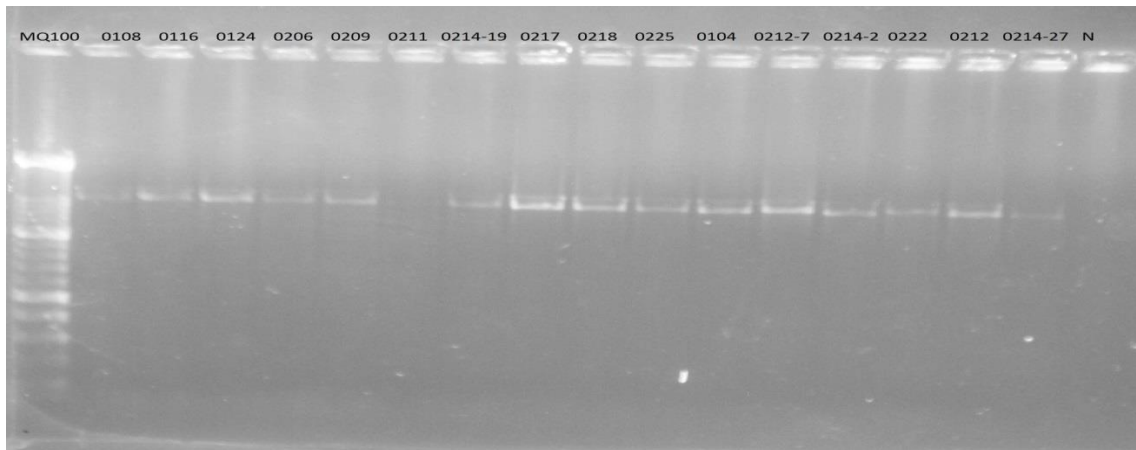


Figure XIII: Profil sans enzyme des 16 souches d'*E.coli* isolées dans les selles diarrhéiques.

M : marqueur XIV 100pb

Les produits de PCR obtenus après amplification avec les amorces ARNr 16S ont été considérés comme contrôles de la réaction de digestion avec l'absence d'enzymes de restriction (Figure 12). Les fragments sont restés intacts avec la taille de 1600 paires de bases environ.

❖ Polymorphisme des souches d'*E.coli* isolées avec l'enzyme *Hae III*

La technique de RFLP avec l'enzyme de restriction *Hae III* a permis d'obtenir le profil de restriction des souches de *E.coli* illustré sur la figure 13.

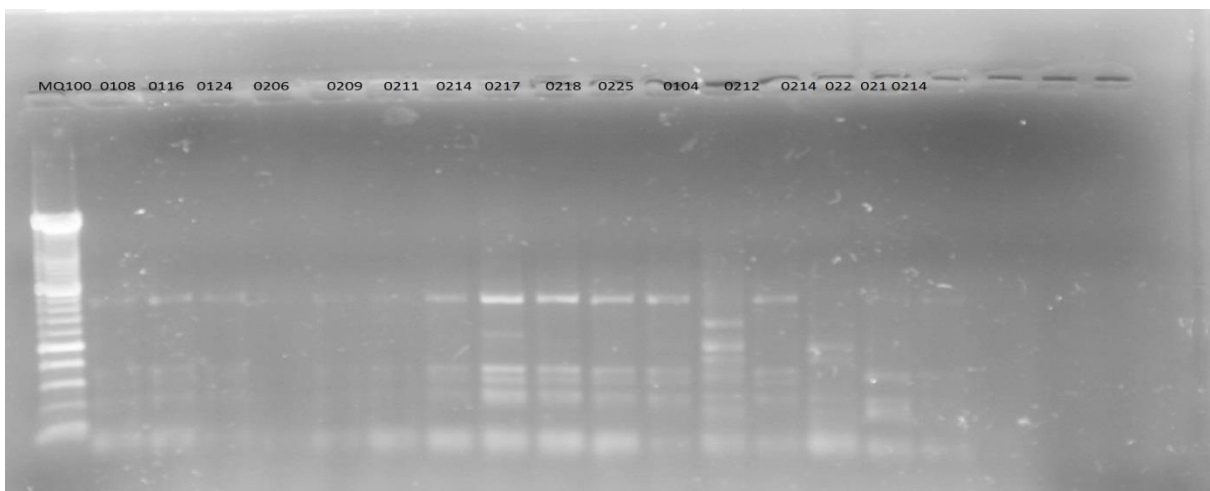


Figure XIV: Profil RFLP avec l'enzyme *Hae III* des 16 souches d'*E.coli* isolées dans les selles diarrhéiques.

Nous observons un polymorphisme de clivage enzymatique, le nombre de fragments digérés va de trois (3) à six (6), soit deux (2) à cinq (5) sites de restriction. Le 1^{er} puits contient le marqueur de poids moléculaire XIV (100pb).

❖ **Polymorphisme des souches d'*E.coli* isolées avec l'enzyme *AluI*.**

La figure 18 représente l'image du gel d'électrophorèse des fragments de restriction obtenus après digestion de l'amplicons par l'enzyme *AluI*.

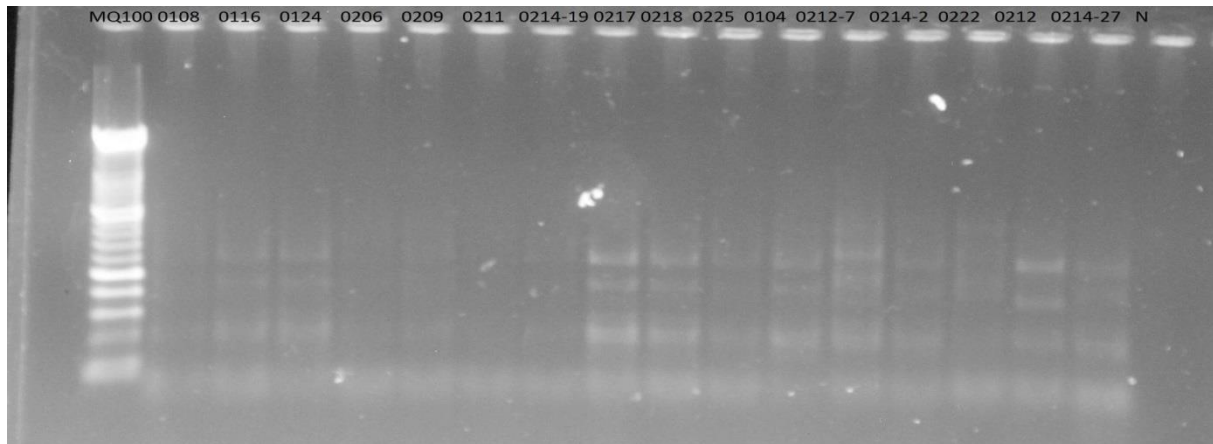


Figure XV: Profil RFLP avec l'enzyme *AluI* des 16 souches d'*E.coli* isolées dans les selles diarrhéiques.

Nous observons un polymorphisme de clivage enzymatique, le nombre de fragments digérés est de 4 par échantillon excepté le 0211, soit trois sites de restriction. Le 1^{er} puits contient le marqueur de poids moléculaire XIV (100pb).

- **Polymorphisme des souches d'*E.coli* isolées avec l'enzyme *EcoRI***

La technique de RFLP avec l'enzyme de restriction *EcoRI* a permis d'obtenir ce polymorphisme.

La figure montre l'image de gel d'électrophorèse des fragments de restriction obtenus après digestion par l'enzyme *EcoRI*.

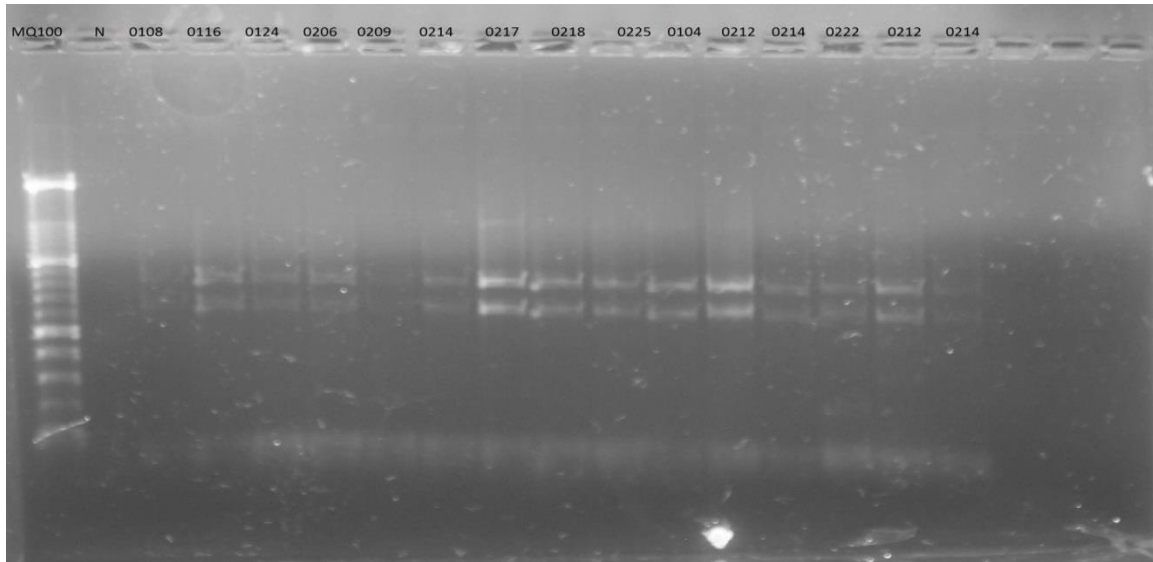


Figure XVI: Profil RFLP avec l'enzyme *EcoRI* des 16 souches d'*E.coli* isolées dans les selles diarrhéiques.

M : marqueur XIV 100pb

Nous observons un polymorphisme de clivage enzymatique, le nombre de fragments digérés est de deux par échantillon, soit un site de restriction.

- **Haplotypes**

Un haplotype correspondant à une combinaison des profils de restriction obtenus après digestion avec les enzymes *Hae* III, *Alu* I et *EcoRI*, possible pour un ensemble d'individus (population ou sous-population).

On peut alors retrouver son haplotype par la combinaison des profils de restriction obtenus par la digestion avec les 3 enzymes.

Tableau XVI : Nombre de sites de restriction par échantillon en comparaison avec ceux des espèces d'E.coli.

Echantillons	<i>AluI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HaeIII</i>	haplo types
0108	3	1	3	A
0116	3	1	3	A
0124	3	1	3	A
0206	3	1	-	
0209	3	1	2	B
0211	-	1	2	
0214-19	3	1	3	A
0217	3	1	4	C
0218	3	1	3	A
0225	3	1	3	A
0104	3	1	3	A
0212-7	3	1	5	D
0214-02	3	1	3	A
0222-16	3	1	3	A
0212-20	3	1	3	A
0214-27	3	1	3	A
ETEC	3	1	3	
O157	3	1	3	
APECO1	3	1	3	
CDCO157	3	1	3	
EC10	3	1	3	

Tableau XVII: Classification des sites de restriction en haplotypes

haplo types	<i>AluI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HaeIII</i>	Fréquence
A	3	1	3	11 (68,75%)
B	3	1	2	1 (6,25%)
C	3	1	4	1 (6,25%)
D	3	1	5	1 (6,25%)
ND	-	-	-	2 (12,5%)

Les résultats de la digestion nous ont permis d'obtenir quatre (04) haplotypes. La différence entre les haplotypes se situait au niveau du nombre de sites de restriction générés par l'enzyme *HaeIII*.

L'haplotype A avec 68,75% était la plus représentée et identique en terme de nombre de sites de restriction aux pathovars EIEC et EAEC ainsi qu'aux trois autres souches d'*Escherichia coli* (souches de référence).

- **Analyse phylogénique des données de clivage enzymatique**

Les échantillons de cas de diarrhée et les espèces d'*E.coli* ont été regroupés suivant le degré de similarité. La figure ci-dessous représente le dendrogramme phylogénique obtenu.

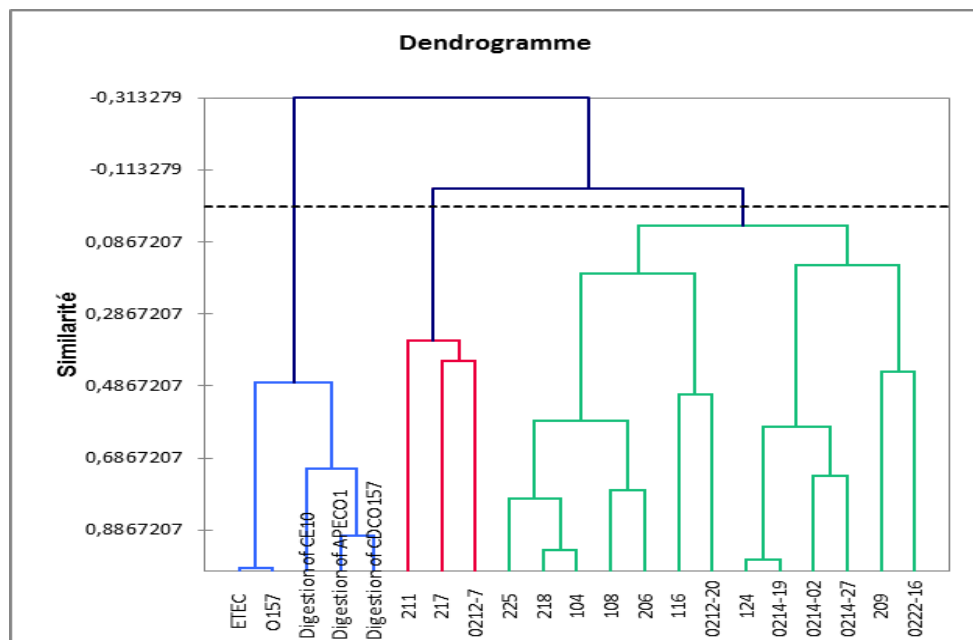


Figure XVII: Dendrogramme des 16 souches d'*E.coli* isolées dans les selles diarrhéiques et les souches d'*E.coli* thermo tolérant contrôle.

Le dendrogramme généré à partir des données de restriction enzymatiques a permis de rassembler les 16 souches d'*E.coli* isolées dans les selles diarrhéiques et les souches de référence d'*E.coli* en 4 sous-groupes basés sur le degré de similarité comme illustré sur la figure XVI.

En se basant sur la taille des fragments de restriction obtenus, il existe une différence entre nos souches isolées et les souches contrôles (*HaeIII* et *AluI*).

- **Recherche d'*E.coli* pathogène par PCR avec les amorces spécifiques**

Tableau XVIII : Répartition des selles diarrhéiques selon le groupe d'étude et la technique utilisée

Technique/groupe	Son de riz		Témoin		Total
Microbiologie	Présence d'E. coli	Absence d'E. coli	Présence d'E. coli	Absence d'E. coli	
	6	1	10	9	26
PCR	E. Coli pathogène	E. Coli non pathogène	E. Coli pathogène	E. Coli non pathogène	
	3	3	4	6	16

Sur les 26 échantillons testés 61,53% (16/26) étaient *E. coli* (10 dans le groupe témoin contre 06 dans le groupe son de riz), par la morphologie des colonies et des tests biochimiques conventionnels comme décrit **(Baylis and al. 2006) (38)**.

Les 16 souches d'*E.coli* isolées dans les selles diarrhéiques par les techniques microbiologique et biochimique ont été soumises à la PCR en utilisant les amorces spécifiques à 5 pathovars d'*E.coli*.

Tableau XIX: Résultat de l'amplification de l'ADN par les amorces spécifiques.

ID	ETEC		EHEC		EPEC		EIEC	EAEC
	eltB	estA	vt1	vt2	eaeA	bfpA	ial	Pcvd432
1040103	0	0	0	0	0	0	0	0
1080104	0	0	0	0	0	0	0	0
1160205	0	0	0	0	0	0	1	0
1170101	0	0	0	0	0	0	0	0
1180103	0	0	0	0	0	0	0	1
1240204	0	0	0	0	0	0	0	1
2050101	0	0	0	0	0	0	0	0
2060201	0	0	0	0	0	0	0	0
2110103	0	0	0	0	0	0	0	0
2120203	0	0	0	0	0	0	0	0
2140201	0	0	0	0	0	0	0	1
2140201	0	0	0	0	0	0	0	1
2140201	0	0	0	0	0	0	0	1
2140201	0	0	0	0	0	0	0	1
2180201	0	0	0	0	0	0	0	0
2220104	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = négatif

1 = positif

La figure XVII montre les résultats de l'amplification par les amorces spécifiques à *E.coli* donnant deux types de pathovars : *EIEC* et *EAEC* des souches isolées comme étant des *Escherichia coli* par les tests biochimiques conventionnels.

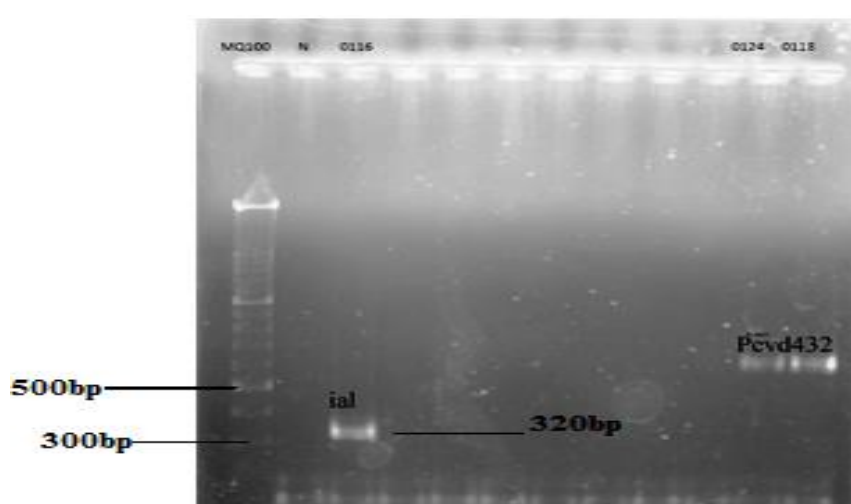
**Figure XVIII: Amplification de souches d'*Escherichia coli* par la PCR avec les amorces spécifiques.**

Tableau XX : répartition des souches pathogènes d'*E.coli*

PATHOVARS	EFFECTIFS	POURCENTAGE
ETEC	0	0
EHEC	0	0
EPEC	0	0
EIEC	1	14,29%
EAEC	6	85,71%
TOTAL	7	100%

Au terme des résultats de la PCR nous avons détecté deux types de pathovars d'*E.coli*.

Le pathovar EIEC représente 14,29% et EAEC 85,71% des gènes détectés dans les souches d'*E.coli* par la méthode microbiologique dans notre population d'étude.

Le groupe témoin avait plus de pathovars (4/7) soit 57,14% que le groupe son de riz (3/7) soit 42,86%.

COMMENTAIRES
ET
DISCUSSION

6. Commentaires et discussion

Le but de notre étude était d'examiner le son de riz comme une nouvelle stratégie pour réduire le dysfonctionnement de l'intestin et le fardeau des maladies diarrhéiques.

Nous avons donc conduit une étude pilote de faisabilité et d'acceptabilité en augmentant la consommation du son de riz chez les enfants à des niveaux qui peuvent améliorer les biomarqueurs de la dysfonction entérique environnementale entre novembre 2015 et mai 2016 à Dioro.

6.1. Lieu d'étude

La commune rurale de Dioro a été choisie pour la réalisation de cette étude. Le choix de Dioro porte sur sa riziculture par excellence, faisant que l'alimentation de base dans cette localité est le riz. Dioro fait partie de la zone office Niger et nous avons l'avantage de travailler sur le plateau technique de laboratoire élevé grâce au programme du Centre International d'Excellence de Recherche sur le Paludisme (ICEMR) basé à Dioro depuis sept (7) ans. Les conditions dont nous avons besoin pour la collecte et le traitement des échantillons n'étaient plus à désirer.

6.2. Méthodologie

Les données de notre étude ont été collectées sur les formulaires de report de cas (FRC) et les données ont été saisies dans une base dans le logiciel Excel version 2010. Cette méthode nous a permis de collecter des données fiables et exploitables.

Lors de l'étude, une équipe multidisciplinaire de supervision était mis en place pour prévenir la survenue d'éventuelles erreurs.

Les sujets étaient cliniquement examinés par un médecin généraliste à l'enrôlement, au cours des visites mensuelles et en cas de maladies diarrhéiques et autres au centre de santé communautaire de Dioro.

Le dépistage se faisait par la clinique et la parasitologie, puis l'enrôlement si le sujet venait à remplir les critères d'inclusion et n'est concerné par aucun critère de non inclusion tout en demandant l'assentiment volontaire et éclairé des parents.

Le suivi des patients s'étendait sur 6 mois ce qui est une première au Mali dans la lutte contre la malnutrition et les maladies diarrhéiques chez les enfants en sevrage.

Aucun sujet n'a été perdu de vue, puisque nous avons avec nous les agents de santé communautaire qui partaient chercher les sujets prenant du retard à se présenter au centre durant leurs suivis.

Au cours de cette étude, aucun participant ne s'est retiré du fait de la tolérance ou des réactions indésirables au son de riz. Le taux de conformité a été exceptionnellement élevé, en partie grâce aux visites quotidiennes des agents de santé communautaires.

Durant les six mois de suivi, les patients dans le bras son de riz prenaient leurs doses du son de riz quotidiennement à domicile sous la supervision d'un agent de santé communautaire, et les doses administrées étaient répertoriées dans la base des données en vue d'une analyse ultérieure.

- **Qualité du produit**

Le Département de l'Agriculture des Etats Unis (USDA, Beaumont, TX) a fourni le son de riz stabilisé par chaleur (Qualité humaine) et qui a été poli à partir des variétés développées aux États-Unis. Le son de riz a été rendu disponible par l'équipe du Dr Elizabeth Ryan, PhD, Professeur Assistant de Nutrition et de Toxicologie à l'université de Colorado.

6.3. Résultat

- **Facteurs démographiques**

Notre étude a porté sur une population très jeune de 50 enfants tous de la localité de Dioro.

La randomisation des participants dans le groupe d'intervention a été faite au cours de la période d'enrôlement dans l'étude. Ces nourrissons ont été randomisés selon le sexe en 2 bras: le bras intervention (son de riz + vitamine A, n = 25) et le bras témoin (vitamine A seulement n=25). Au total 50 nourrissons (n = 50) ont participé à cette étude.

Cette étude a établi que la supplémentation de son de riz est un complément alimentaire approprié associé à une réduction drastique de la maladie diarrhéique et à l'amélioration des résultats de croissance anthropométrique chez les nourrissons à Dioro qui éprouvent la dysfonction entérique environnementale pendant la période critique de sevrage. L'incidence réduite de la maladie diarrhéique avec la consommation de la supplémentation de son de riz est compatible avec des études chez l'animal démontrant une résistance accrue aux Rotavirus associés à la diarrhée, au Norovirus et à *Salmonella enterica Typhimurium* (39).

Les membres de la famille et les participants étaient exceptionnellement conformes à l'intervention, démontrant que la supplémentation de son de riz est une nourriture complémentaire polyvalente pour les soignants à incorporer dans les régimes alimentaires quotidiens et est suffisamment savoureuse pour les bébés en sevrage **(40,41)**. Aucun effet néfaste de la consommation du son de riz n'a été identifié ou signalé, indiquant que la supplémentation de son de riz est un complément alimentaire approprié pour les nourrissons en bonne santé à haut risque de DEE.

- **Paramètres anthropométriques**

La WAZ (rapport poids-âge-z-score en français) moyenne et LAZ (rapport taille-âge-z-score) pour les deux groupes dans cette cohorte d'étude étaient plus élevées que les moyennes documentées pour les nourrissons maliens de 12 mois **(41)**. Cependant, la WLZ (rapport poids-taille-z-score) moyenne dans le groupe témoin était inférieure à la moyenne nationale à 12 mois (6), alors que la moyenne dans le groupe son de riz était plus élevée. Trois participants du groupe témoin ont été admis dans un programme de malnutrition ambulatoire au dernier mois d'étude et immédiatement après la conclusion de l'étude. Deux de ces nourrissons ont connu une malnutrition aiguë sévère (WHZ <-3), et ont également répondu aux critères de retard de croissance (LAZ <-2). L'incidence du retard de croissance et malnutrition a été significativement plus faible dans le groupe son de riz car en utilisant ces calculs anthropométriques pour les Z-Scores, où 0 représente la moyenne mondiale saine, nous avons observé une amélioration des tendances de croissance (relation poids-taille-âge) dans le groupe son de riz. Ainsi, nous avons déterminé que le groupe son de riz a marqué environ 0,6 point de plus pour tous les Z-scores que le groupe témoin à la fin de l'étude.

- **Paramètres biologiques**

La présence des biomarqueurs : la calprotectine, la néoptérine et la myéloperoxydase qui sont des indicateurs de l'inflammation et l'alpha-1-antitrypsine qui est un indicateur de la perméabilité de l'intestin et du transfert de protéines de la circulation sanguine dans la lumière grâce à des jonctions étanches était beaucoup plus visibles dans le bras contrôle que le bras de son de riz.

Les concentrations de tous les biomarqueurs DEE étaient très variables chez les individus dans les deux groupes et dans le temps. Les concentrations moyennes de tous les biomarqueurs ont été élevées, ce qui témoigne de la prévalence de la DEE dans cette

population. Les concentrations médianes légèrement diminuées de CAL dans le groupe supplémentation de son de riz à 8 mois suggèrent une modulation modeste et transitoire de l'inflammation et de la perméabilité intestinale par rapport aux participants témoins.

Cependant, des résultats de croissance améliorée et une incidence de diarrhée réduite, des mécanismes bénéfiques supplémentaires dans l'intestin peuvent avoir lieu sans effets importants sur ces quatre biomarqueurs.

Les résultats de cette étude fournissent des métadonnées riches pour les recherches à venir sur le métabolome médié par le son de riz. L'activité probiotique et photochimique de la supplémentation du son de riz soutient la colonisation des symbiotes microbiens bénéfiques, y compris le *Lactobacillus*, le *Bifidobacterium* et le *Ruminococcus*, ce qui favorise potentiellement la biodisponibilité et l'absorption des nutriments dérivés de l'ensemble du régime. Cet effet n'a pas encore été exploré chez les bébés humains (42).

Cette étude était limitée par le manque d'aveuglement dans le groupe témoin. Les visites quotidiennes effectuées par les ASC (Agents de Santé Communautaire) documentant la consommation et la conformité qui ont permis de rendre compte des pratiques d'alimentation dans le groupe de la supplémentation de son de riz. Ces pratiques n'ont pas été entièrement répliquées dans les ménages du groupe témoin.

Ce «effet Hawthorne» peut avoir augmenté l'apport calorique et la diversité diététique dans le groupe témoin, ce qui affecte positivement les résultats de croissance. Les résultats de cet essai pilote justifient une enquête plus approfondie sur les aliments de sevrage complémentaires à base de son de riz dans des cohortes plus aveugles, pour des durées plus longues et dans des populations géoculturelles supplémentaires avec des taux élevés de DEE, de malnutrition et de retard de la croissance.

- **Paramètres microbiologiques**

Pendant la période de novembre 2015 à mai 2016 un total de 26 échantillons de selle de 18 enfants inclus dans notre population d'étude souffrant de diarrhée a été recueilli. Sur les 26 échantillons **61,53%** (16 /26) ont été soupçonnés comme étant des échantillons contenant des souches d'*E.coli* par les techniques microbiologiques. Ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres tests plus avancés contrairement à une étude menée par (**Al-Gallas, N et coll. en 2007**) (43) qui ont confirmé tous les résultats des tests biochimiques classiques avec le système Api20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) avant d'appliquer la technique moléculaire PCR.

- Paramètres moléculaires

La détection et le génotypage des souches d'*Escherichia coli* pathogènes dans les 16 échantillons de selles diarrhéiques.

Afin de détecter simultanément cinq différents types de pathovars d'*Escherichia coli* [Entérotoxigènes *E. coli* (ETEC), *E. coli* Entéroagrégate (EAEC), *E. coli* Entéropathogènes (EPEC), *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC) et *E. coli* Entéroinvasives (EIEC)] qui sont impliqués dans les cas de diarrhée par PCR, un mélange de huit paires d'amorces spécifiques pour les gènes cibles a été utilisé dans une seule PCR sur 61,54% (16/26) des échantillons de selles diarrhéiques collectés.

En raison de fortes similitudes entre les tailles des bandes, il était difficile de distinguer les bandes individuelles dans certains cas; par conséquent, il était nécessaire de lancer une amorce spécifique PCR sur des colonies isolées pour vérifier la détection de l'isolat suspecté *E.coli*.

Tous les cas de diarrhée enregistrés étaient modérés. Les symptômes cliniques des enfants atteints de diarrhée tels que la fièvre, des vomissements, des nausées, perte d'appétit, des crampes abdominales, les propriétés de selles et le nombre d'épisodes par jour étaient enregistrés.

Sur la base des résultats moléculaires sept (07) échantillons sur seize (16) ont été positifs aux pathovars d'*Escherichia coli* soit 43,75% des échantillons positifs aux tests biochimiques classiques et 26,92% des cas de diarrhée de notre population d'étude. Le groupe témoin avait plus de pathovars (4/7) soit 57,14% que le groupe son de riz (3/7) soit 42,86%. Le pathovar EAEC (*Escherichia coli* entéroagrégate) était le plus représenté avec environ 37,5% suivi d'EIEC (*Escherichia coli* entéro-invasive) 6,25%. Les autres souches pathogènes n'ont pas été détectées. Ce résultat n'est pas similaire à celui d'une étude menée à Tunis en Tunisie entre 2001 et 2004 par (Al-Gallas, N et coll. 2007) (43), sur l'étiologie de la diarrhée aiguë chez les enfants à Tunis, qui ont trouvé *E. coli* enterotoxigénique (ETEC, 32,3%), *E. coli* entéroagrégate (EAEC, 11,3%), *E. coli* entéroinvasives (EIEC, (11,3%) comme étant associé à la maladie diarrhéique avec une différence statistiquement significative (**P < 0,0182**). Cette différence pourrait s'expliquer par la tranche d'âge qui était de un (01) à quinze (15) ans et qui explorent plus leur environnement alors que nos échantillons ont été prélevés entre le 7^{ème} mois et le 12^{ème} mois de vie des nourrissons inclus dans notre population d'étude.

Nos résultats mettent en évidence l'importance d'EAEC comme une cause de diarrhée infantile dans notre population d'étude ce qui est contraire à une étude menée par (**Ifeanyi and al. en 2015**) (**44**) sur les pathotypes d'*Escherichia coli* diarrhéiques isolés chez les enfants atteints de diarrhée dans la capitale fédérale Abuja, au Nigéria dont la tranche d'âge était comprise entre zéro (00) et soixante (60) mois qui ont trouvé EPEC 18/400 soit (4,5%), (ETEC) 16/400 soit (4,0%), (EAEC) 8/400 soit (2,0%), (EHEC) 6/400 soit (1,5%), (EIEC) 3/400 soit (0,8%) et à celui d'une autre étude faite au Nicaragua par (**Vilchez S, et coll.**) en 2004 sur la prévalence de diarrhée due à *Escherichia coli* chez les enfants à Nicaragua (**37**) ont trouvé le pathovar ETEC comme étant associé à la diarrhée dans leur région d'étude avec une prévalence de 20,5% suivi de EHEC 16% et EICE 0,8%.

Le pathovar EAEC reste tout de même émergent car il a été aussi le pathovar le plus courant dans les résultats d'une étude réalisée par (**Hegde and al. en 2012**) (**45**) qui ont rapporté avoir trouvé 26% (52/200) d'EAEC, 16% (32/200) d'EPEC, 3,5% (7/200) d'ETEC et 1,5% (3/200) d'EIEC dans la détection des pathotypes d'*Escherichia coli* chez 200 enfants souffrant de diarrhée.

La faible présence d'EIEC a également été confirmée en Afrique du sud par (**K.B.Omar et coll. en 2014**) (**46**) qui ont trouvé dans les isolats cliniques 04% d'infection due à *Escherichia coli* entéro-invasive et par (**Ifeanyi and al. en 2015**) (**44**) qui n'ont trouvé que 3/400 soit (0,8%) d'EIEC dans leur population d'étude.

Cette étude souligne la nécessité d'une évaluation de routine des enfants diarrhéiques pour la détection des gènes de virulence d'*Escherichia coli*.

CONCLUSION

ET

RECOMMENDATIONS

7. Conclusion et recommandations

7.1. Conclusion

L'administration du son de riz chez les enfants en sevrage est une nouvelle stratégie pour réduire le dysfonctionnement de l'intestin et donc, le fardeau des maladies diarrhéiques dans les pays en voie de développement.

Notre étude a montré que le son de riz est un complément alimentaire savoureux, accepté par la population, approprié qui pourrait être associé à une réduction drastique de la maladie diarrhéique et à l'amélioration de la croissance anthropométrique chez les nourrissons à Dioro pendant la période critique de sevrage.

7.2. Recommandations

Au terme de notre étude, nous recommandons :

- **Au LBMA et partenaires**

- De chercher des financements pour élargir cette étude afin d'avoir des données plus représentatives.

- **Au Ministère de la santé et de l'hygiène publique**

D'appuyer les chercheurs par des ressources nécessaires pour :

- améliorer la sécurité nutritionnelle des enfants de moins de cinq (05) ans
- pour diminuer les maladies diarrhéiques, la malnutrition et le retard de croissance.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

8. Références bibliographiques :

1. Yang X, Wen K, Tin C, Li G, Wang H, Kocher J, et al. Dietary Rice Bran Protects against Rotavirus Diarrhea and Promotes Th1-Type Immune Responses to Human Rotavirus Vaccine in Gnotobiotic Pigs. *Clin Vaccine Immunol*. oct 2014;21(10):1396-403.
2. Millward DJ. Amino acid scoring patterns for protein quality assessment. *Br J Nutr*. août 2012;108 Suppl 2:S31-43.
3. Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2007;(935):1-265, back cover.
4. OMS | Maladies Infectieuses Tropicales. WHO.2016 Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/fr/>
5. Cellule de Planification et de Statistique Secteur Santé, Développement Social et Promotion de la Famille. Mali Enquête Démographique et de Santé (EDSM V) 2012-2013. Disponible sur: <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR286/FR286.pdf>
6. Crane RJ, Jones KDJ, Berkley JA. Environmental enteric dysfunction: an overview. *Food Nutr Bull*. mars 2015;36(1 Suppl):S76-87.
7. Faubion WA, Camilleri M, Murray JA. Improving the detection of environmental enteric dysfunction: a lactulose, rhamnose assay of intestinal permeability in children aged under 5 years exposed to poor sanitation and hygiene. *BMJ Glob Health*. avr 2016.
8. Candiracci M, Justo M, Castaño A. Rice bran enzymatic extract-supplemented diets modulate adipose tissue inflammation markers in Zucker rats. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. avr 2014;30(4):466-72.
9. Oliver SG, Winson MK, Kell DB. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. sept 1998;16(9):373-8.
10. Park H-Y, Lee K-W, Choi H-D. Rice bran constituents: immunomodulatory and therapeutic activities. *Food Funct*. 22 mars 2017;8(3):935-43.
11. Herfel T, Jacobi S, Lin X. Stabilized rice bran improves weaning pig performance via a prebiotic mechanism. *J Anim Sci*. févr 2013;91(2):907-13.

12. Reddy EA, Shaw AV, Crump JA. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* juin 2010;10(6):417-32.
13. Kosek M, Haque R, Lima A. Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants. *Am J Trop Med Hyg.* févr 2013;88(2):390-6.
14. Korpe PS, Petri WA. Environmental enteropathy: critical implications of a poorly understood condition. *Trends Mol Med.* juin 2012;18(6):328-36.
15. MAL-ED Network Investigators. The MAL-ED study: a multinational and multidisciplinary approach to understand the relationship between enteric pathogens, malnutrition, gut physiology, physical growth, cognitive development, and immune responses in infants and children up to 2 years of age in resource-poor environments. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 nov 2014;59 Suppl 4:S193-206.
16. Yapo A, Éric A., Hélène A. Maladies Infectieuses Tropicales. Disponible sur: <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/epilly-trop/epillytrop2016.pdf>
17. Brice , T. Prise en charge de la diarrhée aigue chez les enfants de moins de 5 ans dans le service de pediatrie du centre de sante de référence de la commune v du district de Bamako. MALI FMPOS; 2009 Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2010/med/pdf/10M243.pdf>
18. SIDIBE, T. Aspects épidémio cliniques des diarrhées aiguës chez les enfants de 0 à 59 mois dans le service de pediatrie de l'hôpital régional de Sikasso. BAMAKO FMPOS; 2014. Disponible sur: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2014/med/pdf/14M204.pdf>
19. Kouéta F. Etiologies infectieuses des diarrhées aiguës de l'enfant de 0 à 5 ans au Centre Hospitalier Universitaire Pédiatrique Charles de Gaulle (Ouagadougou, Burkina Faso). *Mali Méd.* 30 juin 2014;29(2):53-7.
20. Cellule de Planification et de Statistique Secteur Santé, Développement Social et Promotion de la Famille. Mali Enquête Démographique et de Santé (EDSM IV) 2006]. Disponible sur: <http://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/FR199/FR199.pdf>

21. PASCALE ,P. Etude épidémiologique des gastro-enterites aiguës médicalisées et spécifiées chez les enfants. [France]: Rouen; 2014 [cité 20 mars 2017]. Thèse de Doctorat Disponible sur: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01085343/document>
22. Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman MM, Carey KE. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun.* févr 1983;39(2):686-703.
23. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* févr 2004;2(2):123-40.
24. AOUZAD .F. Diarrhée à rotavirus. Etude retrospective à l'hôpital militaire d'inscription Mohamed v de Rabat. Université de Rabat. Thèse de pharmacie. N°1915 . juin 2011
25. Lassere MN, Johnson KR, Boers M. Definitions and validation criteria for biomarkers and surrogate endpoints: development and testing of a quantitative hierarchical levels of evidence schema. *J Rheumatol.* mars 2007;34(3):607-15.
26. Lin W-C, Wong J-M, Tung C-C. Fecal calprotectin correlated with endoscopic remission for Asian inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol.* 28 déc 2015;21(48):13566-73.
27. Kapel N, Calprotectine fécale.pdf. 2004; Disponible sur: http://prelevement.reunilab.fr/manuelprev/upload/CALPROTECTINE_FECALE.pdf
28. Savino F, Castagno E, Calabrese R. High faecal calprotectin levels in healthy, exclusively breast-fed infants. *Neonatology.* juin 2010;97(4):299-304.
29. Florent C, L'Hirondel C, Desmazes C. Intestinal clearance of alpha 1-antitrypsin. A sensitive method for the detection of protein-losing enteropathy. *Gastroenterology.* oct 1981;81(4):777-80.
30. Société Française de Biologie Clinique et de la section G de l'Ordre des pharmaciens GUID-EXAM-FEV08 guidebio150x210decembre2007 18/01/08 16:19 Page 68. 250 examens de laboratoire, 12e édition [Internet]. france: Société Française de Biologie Clinique et de la section G de l'Ordre des pharmaciens; 68 p. Disponible sur: <https://fr.slideshare.net/salahabdessemed1/250-examens-de-laboratoire-12e-dition>

31. Fuchs D, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R. The role of neopterin in atherogenesis and cardiovascular risk assessment. *Curr Med Chem*. 2009;16(35):4644-53.
32. Prendergast A J, Rukobo S, Chasekwa B. Stunting is characterized by chronic inflammation in Zimbabwean infants. *PloS One*. 2014;9(2):e86928.
33. Bhutta ZA, Das JK, Rizvi A. Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: what can be done and at what cost? *Lancet Lond Engl*. 3 août 2013;382(9890):452-77.
34. Mojica CM, Parra-Medina D, Yin Z, Akopian D, Esparza L. Assessing media access and use among Latina adolescents to inform development of a physical activity promotion intervention incorporating text-messaging. *Health Promot Pract*. juill 2014;15(4):548-55.
35. DeBoer MD, Lima AAM, Oría RB. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutr Rev*. nov 2012;70(11):642-53.
36. Geneva: World Health Organization; 2011. Guideline: Vitamin A Supplementation in Infants and Children 6–59 Months of Age - PubMed - NCBI. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=WHO.+Guideline%3A+Vitamin+A+supplementation+in+infants+and+children+6%E2%80%9359+months+of+age.+Geneva%3A+World+Health+Organization%2C+2011>.
37. Vilchez S, Reyes D, Paniagua M. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. *J Med Microbiol*. mai 2009;58(Pt 5):630-7.
38. Baylis CL, Penn CW, Thielman NM. *Escherichia coli* and *Shigella spp*. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John Wiley & Sons, Ltd; 2006 [cité 10 juin 2017]. p. 347-65.
39. Lei S, Ramesh A, Twitchell E. High Protective Efficacy of Probiotics and Rice Bran against Human Norovirus Infection and Diarrhea in Gnotobiotic Pigs. *Front Microbiol*. 2016;7:1699.
40. Ogbo FA, Agho K, Ogeleka P. Infant feeding practices and diarrhoea in sub-Saharan African countries with high diarrhoea mortality. *PloS One*. 2017;12(2):e0171792.

41. Ayoya M Ag, Kodio J, Iknane A Ag. Nutritional value of locally produced foods and potential for developing age-appropriate complementary foods for children under 2 years of age in Mali. *Food Nutr Bull.* sept 2010;31(3):391-9.
42. Sheflin AM, Borresen EC, Wdowik MJ. Pilot dietary intervention with heat-stabilized rice bran modulates stool microbiota and metabolites in healthy adults. *Nutrients.* 16 févr 2015;7(2):1282-300.
43. Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *Am J Trop Med Hyg.* sept 2007;77(3):571-82.
44. Ifeanyi CIC, Ikeneche NF, Bassey BE. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. *J Infect Dev Ctries.* 19 févr 2015;9(2):165-74.
45. Hegde A, Ballal M, Shenoy S. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Indian J Med Microbiol.* sept 2012;30(3):279-84.
46. Omar KB, Barnard TG. Detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in clinical and environmental water sources in South Africa using single-step 11-gene m-PCR. *World J Microbiol Biotechnol.* oct 2014;30(10):2663-71.

FICHE SIGNALÉTIQUE**Nom :** DOUYON**Prénom :** Seydou**Tel :** (00223)-75365199 **E-mail :** seydoudouyon522@yahoo.fr**Titre de la thèse :** Impact du Son de Riz sur la Croissance et La Prévention de la Diarrhée Chez les Enfants en Sevrage à Dioro : Cas de 50 Enfants**Nationalité :** Malienne**Année Universitaire :** 2016-2017**Ville de soutenance :** Bamako-Mali**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.**Secteur d'intérêt :** Santé publique, Parasitologie Moléculaire, Toxicologie, Agriculture.**RESUME**

Notre étude portait sur l'impact du son de riz sur la croissance et la prévention de la maladie diarrhéique chez les enfants en sevrage à Dioro. Notre objectif était d'évaluer la faisabilité et l'acceptabilité du son de riz chez les enfants en sevrage à Dioro entre Novembre 2015 et Mai 2016 à Dioro, Mali. Au total 50 nourrissons étaient inclus dans cette étude (25 dans le groupe son de riz et 25 témoins). Des formulaires de report de cas étaient utilisés pour estimer le taux de consommation du son de riz et les épisodes diarrhéiques. Pour évaluer l'impact du son riz, des mesures anthropométriques mensuelles ont été effectuées durant six mois. Des souches d'*E.coli* isolées à partir des échantillons de selles collectées lors des épisodes diarrhéiques ont été génotypées. Le taux de consommation moyenne du son de riz était compris entre 99,55% et 100%, ce qui montre son acceptabilité par les enfants. Les Z-Scores obtenus à partir des données anthropométriques montrent que le groupe son de riz a marqué en moyenne 0,6 point de plus que le groupe témoin. Les participants du groupe de son de riz ont connu collectivement moins de diarrhées (7 épisodes) que le groupe témoin (19 épisodes). La PCR multiplexe des souches d'*E.coli* isolées a révélé deux types de pathotypes. Le pathotype *EAEC* était le plus représenté avec 37,5% et *EIEC* 6,25%. Le groupe témoin avait plus de pathotypes (57,14%) que le groupe son de riz (42,86%). Cette étude a établi que la supplémentation en son de riz est acceptable, associée à une réduction drastique de la maladie diarrhéique et à une meilleure croissance des nourrissons en sevrage à Dioro, Mali.

Mots clés : Son de Riz ; Diarrhée; Croissance; *Escherichia coli*

IDENTIFICATION SHEET**Last Name:** DOUYON**First Name:** Seydou**Tel:** (00223)-75365199 **E-mail:** seydoudouyon522@yahoo.fr**Title of the thesis:** Impact of rice bran on growth and prevention of diarrhea among weaning children in Dioro: case of 50 children**Academic Year:** 2016-2017**City of defence:** Bamako-Mali**Place of deposit:** Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology**Focus area:** Public Health, Molecular Parasitology, Toxicology, and Agriculture.**ABSTRACT**

Our study focuses on the impact of rice husk on the growth and prevention of diarrheal disease in weaning children in Dioro. Our objective was to evaluate the feasibility and acceptability of rice sirt in weaning children in Dioro between November 2015 and May 2016 in Dioro, Mali. A total of 50 infants were included in this study (25 in the rice bran group and 25 controls). Consumption report forms to estimate rice son consumption rate and diarrheal episodes. To evaluate the impact of its rice, monthly anthropometric measurements were carried out for six months. Strains of E.coli isolates from stool samples collected during diarrheal episodes were genotyped. The average consumption rate of the rice yarn was between 99.55% and 100%, which shows its acceptability by children. The Z-scores obtained from anthropometric data show that the sound group of rice marked on average 0.6 points more than the control group. Participants in the group of rice threads collectively experienced fewer diarrheas (7 episodes) than the control group (19 episodes). The multiplex PCR of isolated E.coli strains revealed two types of pathotypes. The EAEC pathotype was the most represented with 37.5% and EIEC 6.25%. The control group had more pathotypes (57.14%) than the rice bran group (42.86%). This study found that rice bran supplementation is acceptable, coupled with a reduction in diarrheal disease and disease to better growth of weaning infants in Dioro, Mali.

Key words: Rice bran; Diarrhea; Growth; Escherichia coli

SERMENT DE GALIEN



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

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

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

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

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels,
Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,

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

Je le jure!