

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THÈSE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLÔME DE
DOCTORAT 3ÈME CYCLE (LMD)

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE

OPTION : MICROBIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET PROTÉOMICS

INTITULÉ

Impact de la carence en fer et l'infection sur le système immunitaire
Chez des enfants: production des siderophores par Pseudomonas

Présentée par: Rahmani Soraya

DEVANT LE JURY:

PRESIDENT :	Abbouni B.	PROFESSEUR	UDL SBA
EXAMINATEURS :	SLIMANI M.	PROFESSEUR	UNIV SAIDA
	AOUES A.	PROFESSEUR	UNIV ORAN
	Benali M.	PROFESSEUR	UDL SBA
	Kerfouf A.	PROFESSEUR	UDL SBA
RAPPORTEUR:	DEMMOUCHE. A	MCA	UDL SBA

Année universitaire: 2014/2015

Dédicace

Après toutes les années d'efforts et de sacrifices et avec l'aide de

Dieu le tout puissant, je Suis arrivée au terme de mes études; à cette

Occasion je dédie ce travail à :

Mes parents qui m'ont soutenu et motivé sans perdre confiance en moi.....

A toi Maman...Tu as su me transmettre une base solide sur laquelle j'ai

*grandi Puisse Dieu, le tout puissant, vous combler de santé, de bonheur et vous
procurer longue vie. MERCI POUR TOUT.*

A mes trios perles : MAHI. ASSIA et HANANE

LES MOTS M'ÉCHAPPENT LORSQUE JE PARLE DE VOUS.....QUE DIEU

VOUS GARDE ET VOUS PROTEGE.....

*A MES FRERES ET SŒURS. Je vous dédie ce travail en témoignage de l'amour
et du soutien que vous m'avez toujours donné. Que Dieu vous protège
consolide les liens sacrés qui nous unissent.*

A Kelthouma avec qui j'ai partagé mon quotidien pendant ces années....qui a supporté tous les détails de la vie de mes bactéries... Merci d'avoir essuyé mes larmes pour les jours où rien n'allait et d'avoir traversé avec moi l'euphorie des manip.... Merci à toi d'avoir été là.

REMERCIEMENTS

Louange à **Allah** maitre de l'univers pour toutes ces bontés,
Pour la science qui nous a enseigné, pour l'esprit qui nous
Illumine, pour la foie qui sème nos cœurs, pour sa miséricorde.
Je remercie vivement et chaleureusement mon encadreur
« **Mme Demmouche** » qui a accepté de diriger ce travail
avec patience et amabilité...Au delà de l'encadrement
académique, elle a su me transmettre sa passion et sa vision de
la science et de la vie...Merci de m'avoir découvrir les beaux
cotés de la vie à travers la science ; Merci pour tout...

J'adresse mes sincères remerciements au « **Pr**
Abbouni » : Je suis très sensible à l'honneur que vous m'avez
fait en acceptant la présidence de ce travail. Veuillez accepter,
cher maître, mes sincères remerciements et toute la
reconnaissance que je vous témoigne

Je remercie les examinateurs qui m'ont fait un honneur
en siégeant dans le jury de cette thèse. Je suis très touchée et

*reconnaissante de la spontanéité et la gentillesse avec laquelle
vous avez accepté de juger ce travail.*

*Veillez croire, chers maîtres, à l'assurance de mes respects et
mes considérations.*

*Et à tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près pour réaliser ce
modeste travail.*

Les Abréviations

GR : Globule Rouge

GB: Globule blanc

Hb: Hémoglobine

Ht: Hématocrite

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

VGM : Volume Globulaire Moyenne

EHS : Etablissement Hospitalier de santé

EHU : Etablissement Hospitalier Universitaire.

IgG : Immunoglobuline G.

IgA : Immunoglobuline A.

IgM : Immunoglobuline M.

IgD: Immunoglobuline D.

IgE: Immunoglobuline E.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

FAO: Food and Agriculture organization (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

GALT: Gastro-intestinal Associated lymphoïde tissu.

BALT: Broncho-pulmonaire Associated lymphoïde tissu.

MALT: Mucosa (muqueuse-cutanée) Associated lymphoïde tissu.

HLA: Human leucocyte locus A.

LT CD4 : lymphocyte T (= thymus), CD4: Cluster de différenciation 4.

HIV: Human immunodeficiency virus (Virus de l'immunodéficience humaine/Syndrome d'immunodéficience acquise).

Hg 623nm : utilisation d'un Eppendorf Hg, par une lampe photométrie 623nm.

Etalon STD : étalon standard.

Tampon TRIS : Tris (hydroxymethyl) aminomethan

Fl: femtolitre.

Mg: milligramme.

mm³: millimètre.

µg: microgramme.

R: corrélation.

P: la différence.

DL: décilitre.

ML: millilitre.

µl: microlitre.

CR : cartouche de réaction.

G: gramme

Pg: picogramme.

Fe³⁺: Fer ferrique.

Fe²⁺: Fer ferreux.

DO : Densité Optique.

UV : Ultra Violet.

UFC : Unité Formant Colonie.

MC : Mac Ferland.

Résumé

En vue de réaliser une évaluation sur le terrain du statut en fer des enfants âgés de 2 ans à 12 ans et du retentissement d'une éventuelle carence en fer sur le système immunitaire, deux études prospectives ont été effectuées. La première étude fut réalisée au niveau de l'EHU d'Oran et avait pour objectif de chercher la corrélation entre les différents paramètres de statut en fer et les immunoglobulines et la seconde a été réalisée au service de pédiatrie de Sidi Bel Abbès pour établir la relation entre la carence en fer et l'infection. La population cible est composée de 827 enfants. Les enfants ont bénéficié d'un bilan sanguin comportant l'hémogramme, la ferritinémie, le fer sérique et les immunoglobulines (**IgG, IgA, IgM**), aussi le lien entre le fer, l'infection et la production de siderophores n'a pas été négligé.

Après réalisation des analyses hématologiques, il s'est avéré que 50,5% sont anémiques (**Hb <11g/dl**), alors que le reste soit 49,5% représente les enfants non anémiques (**Hb ≥ 11g/dl**).

Les résultats que nous avons tirés à partir de cette étude montrent que les taux de différents paramètres hématologiques et biochimiques (**fer sérique, ferritine, Hb, VGM, HT, CCMH, TCMH**) présentent une différence significative entre les deux groupes (**témoin et d'étude**). (**p < 0.05**)

Quant aux cellules immunitaires, nous avons relevé que le taux des neutrophiles est plus bas chez les enfants anémiques par rapport aux enfants non anémiques (**p < 0.0001**).

Le taux des lymphocytes est de (**71.09 ± 5.02**) Chez les enfants anémiques et il est de (**58.74 ± 8.40**) chez les enfants non anémiques (**P < 0.001**)

En ce qui concerne l'immunité humorale, les résultats montrent que les taux des IgG, IgM et IgA présentent une différence significative entre les deux groupes (**témoin et d'étude**), (**p < 0.0001**).

Une forte corrélation positive est notée entre le taux de l'hémoglobine, l'hématocrite, le VGM, TCMH, CCMH et la ferritine, le fer sérique et les IgG est respectivement (**r = 0.67, r = 0.62, r = 0.43, r = 0.44, r = 0.30, r = 0.48, r = 0.63**). Mais pratiquement aucune corrélation n'est notée entre le taux de l'hémoglobine et l'âge (**r = - 0.016**).

Une sensibilité aux infections a été observée chez les enfants atteints d'anémie par carence martiale. Le résultat de l'enquête épidémiologique a démontré que ces infections ont été causées par différents germes pathogènes dont *Pseudomonas*. Nous nous sommes intéressés à cette bactérie en termes de sa capacité à synthétiser des siderophores qui sont des chélateurs de fer. Nous avons pu isoler 30 souches du genre *Pseudomonas* dont on a effectué le dosage des siderophores. Nous avons constaté que la concentration de ces derniers a été significativement supprimée par l'addition d'un bactériostatique qu'on a supposé l'existence dans le sérum de ces enfants malades.

Pour conclure, nous pensons que l'immunité humorale et cellulaire est affectée par la carence en fer et que la séquestration des siderophores par le siderocalin représente une attaque directe sur un mécanisme important d'acquisition du fer.

Mots-clés

Carence – immunité – infection – siderophores – siderocalin.

المخلص

من أجل تقييم نسبة الحديد عند الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين السنة 2 إلى 12 سنة، وتأثير نقص الحديد الممكن على الجهاز المناعي، أجرينا دراسة استطلاعية في المركز الاستشفائي الجامعي بوهران قسم الأطفال، وذلك بهدف إيجاد العلاقة بين قياسات الحديد و ألا جسام المضادة والدراسته الثانية أجريت بسيدى بلعباس قسم الأطفال وذلك لتسليط الضوء على قابلية هذه الفئة من ألا أطفال المصابين بفقر الدم للعدوى. الفئة المستهدفة تتكون 827 طفلا.

-أجرينا فحصا دموي للأطفال يضم كلا من: تعداد الدم، فيريتين المصل، حديد المصل، و الأجسام المناعية (المجموعة المناعية: المناعي ايفا، مفتش المناعية، الغلوبولين المناعي).

-من خلال هذه الدراسة المحصل عليها تبين النتائج أن 50,5% يعانون من فقر الدم (الهيموغلوبين < 11 غ/دل)، في حين أن النسبة المتبقية وهي 49,5% تمثل الفئة الغير مصابة بفقر الدم (الهيموغلوبين ≥ 11 غ/دل).

-أظهرت النتائج أن معدلات مختلف قياسات الدم والكيمياء الحيوية (الحديد في الدم، الفيريتين، الهيموغلوبين، متوسط الحجم الكروي، الهيماتوكريت، تركيز الجسيمات (أو الكريات) المتوسط للهيموغلوبين، حجم جسيمات الكرية الوسطي للهيموغلوبين) فروق ذات دلالة إحصائية بين المجموعتين (مراقبة ودراسة). (ف > 0.001).

-في ما يخص الخلايا المناعية، وجدنا أن نسبة المعدلات كان أقل لدى الأطفال المصابين بفقر الدم مقارنة مع الأطفال دون فقر الدم (ف > 0.0001).

بالنسبة لمعدل التفاوتات عند كلتا المجموعتين (مراقبة ودراسة) على التوالي: (58.74±8.40 ; 71.09±5.02).

-فيما يتعلق بالمناعة الخلطية، فقد بينت النتائج أن معدل مفتش المناعية وجود اختلاف جوهري بين المجموعتين (مراقبة ودراسة)، (ف > 0.0001).

-بينت النتائج من وجود علاقة إيجابية قوية بين معدل الهيموغلوبين و الهيماتوكريت، متوسط الحجم الكروي، حجم جسيمات الكرية الوسطي للهيموغلوبين، تركيز الجسيمات (أو الكريات) المتوسط للهيموغلوبين، حجم جسيمات الكرية الوسطي للهيموغلوبين على التوالي ص = 0.67، ص = 0.62، ص = 0.43، ص = 0.44، ص = 0.30، ص = 0.48، ص = 0.63 و بين المفتش المناعي و مصل الحديد، ولكن عمليا لا علاقة لوحظت بين معدل الهيموغلوبين والس ص = 0.016.

وقد تمكنا من إيجاد قابلية العدوى للأطفال الذين يعانون من نقص الحديد في دراستنا وقد قمنا بالتركيز على البكتيريا المسماة "Pseudomonas" نتيجة لقدرتها على إنتاج "Siderophores" كوسيلة للحصول على الحديد من الوسط الذي تعيش فيه. وقد تمكنا من عزل 30 عينة من هذه البكتيريا. و قمنا كذلك بقياس تركيز "siderophores" قبل وبعد إضافة "siderocalin" الذي يمثل هجوما على آلية اكتساب العديد من طرف "siderophores" «لأننا وجدنا فرق ذا دلالة إحصائية كبيرة.

و في الختام، نعتقد أن المناعة الخلطية و الخلوية تتأثر بنقص الحديد في الدم.

الكلمات المفتاحية:

نقص- المناعة- عدوى- سيد بير وفور- سيد يرو كلأن.

Summary

*In order to achieve a field evaluation of iron status of children aged from 2 to 10 years and the impact of a possible iron deficiency on the immune system, a prospective studies were conducted in EHU of Oran in order to sursh the probable correlation between the differents parameters of iron status and the immunoglobulins, the second one was done in the pediatric service of Sidi Bel Abbes and its objectives were to establish the relation between the iron deficiency and the infections. The target population consists of 827 children. The children received a blood comprising blood count, serum ferritin, serum iron and immunoglobulins (**IgG, IgA, and IgM**).*

*After completion of hematology, it was found that 50, 5% were anemic (**Hb <11 g / dL**), while the remaining 49, 5% represents non-anemic children (**Hb ≥ 11 g / dL**). The results we have learned from this study show that rates of various hematological and biochemical parameters (**serum iron, ferritin, Hb, MCV, HT, MCHC, and MCH**) show a significant difference between the two groups (**control and study**). (**p <0.05**).As immune cells, we found that the percentage of neutrophils was lower in children with anemia compared with children without anemia (**p <0.0001**). The rate of Neutrophils is (**71.09±5.02**) in children with anemia and it is (**58.74±8.40**) in children without anemia. (**p<0.001**), Thus, we have excluded any influence of the age on immune function (**p=-0016**).*

A susceptibility to infections has been observed in children with iron deficiency in our study. Our investigations have shed light on Pseudomonas addition to its ability to synthesize and release enterobactin-related siderophores as a way of obtaining iron from their environnement. We continued our experiments in order to characterize the concentration of siderophores produced by 30 specimens of pseudomonas isolated from 30 children's with IDA and suffered from different diseases. In the same time, we found that the percentage of the siderophores was significantly suppressed by the addition of a recombinant siderocalin in the medium of culture. These results suggest the sequestration of iron-loaded siderophores by siderocalin represents a direct attack on an important iron acquisition mechanism.

In conclusion, we believe that the humoral and cellular immunity is affected by iron deficiency and that these investigations provide support for earlier suggestions that siderocalin may be involved in moving iron into or out of cells.

Key Worlds

Iron deficiency, Immunity, Infection, siderophores, siderocalin.

TABLE DES MATIERES

I-INTRODUCTION.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I.	
MALNUTRITION.....	3
I-1 -POPULATION VULNERABLE A LA MALNUTRITION.....	3
I-2-LA MALNUTRITION DES ENFANTS DANS LE MONDE.....	3
I-3-LES CONSEQUENCES DE LA MALNUTRITION	4
I-3-1-DEFAUT DE CROISSANCE.....	4
I-3-2-DIFFICULTE D'APPRENTISSAGE.....	4
I-3-3-L'INSUFFISANCE STATURALE.....	4
I-4-MALNUTRITION CHEZ LES ENFANTS EN ALGERIE.....	5
I-5-IMPORTANCE DE LA MALNUTRITION	6
I-6-ETAT NUTRITIONNEL, SYSTEME IMMUNITAIRE ET RESISTANCE AUX INFECTIONS.....	7
I-7-L'EFFET EN RETOUR SUR L'ETAT NUTRITIONNEL.....	11
CHAPITRE II.	
LE FER DANS L'ORGANISME.....	12
II-I -ROLE DU FER DANS L'ORGANISME.....	12
II-2-LES BESOINS ET LES PERTES EN FER	15
II-2-1-LES BESOINS.....	16
II-2-2-LES PERTES	17
II-2-2-1-LES GROSSESSES	18
II-2-2-2-LA CROISSANCE	18
II-2-3-LA LACTATION	18
II-3-METABOLISME DU FER.....	19
II-3-1-ABSORPTION DU FER.....	19
II-3-2-REGULATION DE L'ABSORPTION DU FER.....	19
II-4-CARENCE EN FER.....	20

II-4-1-MECANISME	
PHYSIOPATHOLOGIQUE.....	20
II-4-1-1-EPUISEMENT DES RESERVES EN FER.....	20
II-4-1-2-CARENCE PRECOCE EN FER FONCTIONNEL	20
II-4-1-3-ANEMIE LIEE A UNE CARENCE EN FER	21
II-4-1-3-1-INCIDENCE SUR LA SANTE	21
II-5- RESISTANCE A L'INFECTION.....	22
II-6- GENERALITE SUR L'ANEMIE.....	23
II-6-1-LES ANEMIES AREGENERATIVES (GENERALES).....	24
II-6-1-1-LES ANEMIES MICROCYTAIRES ET HYPOCHROMES.....	24
II-6-1-1-1-LE TAUX DU FER SERIQUE ET LA FERRITINE EST DIMINUE	25
II-6-1-1-2-LE TAUX DU FER SERIQUE EST DIMINUE MAIS LA FERRITINE EST NORMALE OU AUGMENTE.....	26
II-6-1-1-3-LE TAUX DU FER SERIQUES NORMALE OU AUGMENTE.....	26
II-6-1-2- LES ANEMIES MACROCYTAIRES.....	26
II-6-1-3- LES ANEMIES NORMOCYTAIRE NORMOCHROME.....	27
II-6-2- LES ANEMIES REGENERATIVES (PERIPHERIQUES).....	28
II-6-2- 1- LES ANEMIES HEMOLYTIQUES CHIMIQUES.....	29

CHAPITRE III.

L'anémie De La Carence En Fer chez L'Enfant.....	30
III-1- BESOIN EN FER CHEZ LES NOURRISSONS ET LES ENFANTS.....	30
III-1-1- BESOIN PHYSIOLOGIQUE AUGMENTES	32
III-1-2- CARENCE D'APPORT ET DIMINUTION DE L'ASSIMILATION.....	32
III-1-3- LES HEMORRAGIES.....	32
III-1-3-1-DIAGNOSTIC DE LA FORME TYPIQUE DE LA CARENCE MARTIALE DU NOURRISSON	32
III-1-4- L'INTERROGATOIRE	33
III-1-4-1-LES SIGNES CHIMIQUES	33
III-1-4-2-LES SIGNES BIOLOGIQUES.....	33

CHAPITRE IV.

LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	36
IV-1- DEFINITION	36

IV-2- SYSTEME IMMUNITAIRE.....	37
IV-2-1-MECANISME DE LA DEFENSE	38
IV-2-2-MECANISME DE LA DEFENSE NON SPECIFIQUE	39
IV-2-2-1-BARRIERE PHYSIQUE.....	39
IV-2-2-2-CELLULE PHAGOCYTAIRE.....	39
IV-3- REACTION INFLAMMATOIRE	42
IV-4-SYSTEME LYMPHATIQUE.....	43
IV-5- SYSTEME DE LA DEFENSE SPECIFIQUE	44
IV-5-1-COMPLEXE MAJEURE D'HISTOCOMPTABILITE.....	45
IV-6- SYSTEME IMMUNITAIRE HUMORALE	46
IV-6-1-LES LYMPHOCYTES B.....	46
IV-6-2-LES ANTICORPS	47
IV-6-2-1-ROLE DES ANTICORPS	47
IV-6-2-2-LES DIFFERENTES IMMUNOGLOBULINES.....	48
IV-7- SYSTEME IMMUNITAIRE CELLULAIRE.....	48
IV-7-1- LES LYMPHOCYTES T.....	49
IV-7-1-1- TYPES DE CELLULES T.....	49

CHAPITRE V.

L'infection à *Pseudomonas* et la production de siderophores

V-Introduction Générale.....	50
V-1-Distribution environnementale.....	51
V-2-Le modèle <i>P. aeruginosa</i>	52
V-2-1-Description.....	53
V-2-2-Habitat et niche écologique.....	54
V-2-3-Nutrition et conditions de croissance.....	54
V-3-Taxonomie.....	55
V-4-L'acquisition du fer.....	55
V-4-1-Les siderophores.....	56

V-4-2- Production de pigments hydrosolubles par certaines espèces du genre <i>Pseudomonas</i>	57
V-4-3-Les pyoverdines.....	57
V-4-4-Pigments phénaziniques.....	58
V-5-Pouvoir pathogène.....	59
V-5-1-Implications Clinique.....	59
V-5-2-Pathogénicité et toxicité dans les infections respiratoires.....	59
V-5-3-Établir une infection chronique.....	60
V-5-4-Le biofilm.....	61
V-5-6-Les exo polysaccharides (EPS).....	63
V-5-7-Pili et flagelle de <i>P. aeruginosa</i>	63
V-5-8-Les pilis ou fimbriae.....	64
V-6-Résistance aux antibiotiques.....	64
V-7- Siderocalin.....	66

VI- CHAPITRE VI.

Partie 1 : Matériel et Méthode.

VI-1- OBJECTIF DE L'ETUDE	67
VI-2- METHODOLOGIE.....	68
VI-2-1- ECHANTILLONNAGE.....	68
VI-3- METHODES	68
VI-3-1- PREPARATION DE L'ENQUETE	68
VI-3-2- EXAMEN CLINIQUE	68
VI-3-3- ETUDE BIOLOGIQUE	68
VI-4- PRINCIPE DU DOSAGE DU FER SERIQUE.....	69
VI-5- PRINCIPE DU DOSAGE DE LA FERRITINE	70
VI-6- DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES.....	72
VI-7-Etude Statistique.....	73
VI -8-Partie bactériologique.....	74
VI-8-1-Objectif.....	74

VI-8-2-Echantillonnage.....	74
VI-8-3-Stratégie d'isolement.....	74
VI-9-Estimation de la production de siderophores de type pyoverdine avant l'addition du sérum humain supposé contenir : siderocalin.....	76
VI-9-1-Identification des isolats retenus.....	76
VI-9-2-Identification phénotypique des isolats.....	76
VI-9-3-Procédure d'identification biochimique par système API (20NE).....	79
VII-9-4-Estimation de la production de siderophores de type pyoverdine après l'addition du sérum humain supposé contenir : siderocalin.....	80

Partie 2 : Résultat et discussion

VI-10-Résultat (étude statistique).....	83
VI-10-1-Résultat de la partie Bactériologique.....	95
VI-10-2-Essai d'isolement des <i>Pseudomonas fluorescences</i>	95
VI-10-3-Estimation de la production de siderophores de type pyoverdine avant l'addition de sérum humain.....	100
VI-10-4-Estimation de la production de siderophores de type pyoverdine après l'addition de sérum humain.....	105
VI-10-5-Identification des candidats retenus.....	109
VI-10-5-1-Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies et diffusion des pigments.....	109
VI-10-5-2-Observation microscopique à l'état fixé.....	111
VI-10-5-3-Détermination du type respiratoire et test de catalase.....	112
VI-10-5-4-Identification par la galerie API 20NE.....	114
VI-10-6-Optimisation des facteurs de la production de siderophores réalisée sur la souche la plus performante : C33-2.....	116

VI-10-6-Discussion générale.....118

CONCLUSION.....123

Annexe et Glossaire

Références Bibliographiques.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Mortalité liée aux infections (<i>en millions d'enfants de moins de 5ans</i>).....	07
Tableau 02 : Récapitulatif des effets de la malnutrition sur le système immunitaire	09
Tableau 03 : Influence de l'état nutritionnel sur les maladies infectieuses	10
Tableau 04 : Besoin et apports quotidiens en fer.....	16
Tableau 05 : Teneur en fer des aliments.....	17
Tableau 06 : Les symptômes physiques et cliniques lors d'une carence en fer.....	22
Tableau 07 : Définition de l'anémie (d'après OMS).....	24
Tableau 08 : Valeurs normales de la numération des globules rouges <i>en fonction de l'âge</i>	34
Tableau 09 : Valeurs normales et pathologiques de la ferritine et du fer sérique.....	35
Tableau 10 : Les différents types de leucocytes.....	44
Tableau 11: Paramètres d'évaluation du statut en fer (<i>moyenne $\pm$ SD, Effectifs.</i>) De <i>l'ensemble de l'échantillon et comparaison entre le groupe d'étude (Enfants anémiques) et le</i> <i>groupe témoins (enfants non anémiques)</i>	75
Tableau 12 : Résultat de l'immunité cellulaire (%).....	78
Tableau13: résultats de L'Immunité humorale (mg/100ml).....	80
Tableau 14: Paramètres d'évaluation du statut en fer (<i>moyenne $\pm$ SD, Effectifs.</i>) De <i>l'ensemble de l'échantillon et comparaison entre le groupe d'étude (Enfants anémiques) et le</i> <i>groupe témoins (enfants non anémiques)</i>	83
Tableau 15 : Résultat de l'immunité cellulaire (%).....	84
Tableau 16 : Résultats de L'Immunité humorale (mg/100ml).....	84
Tableau 17 : Codification des colonies des souches isolées.....	97
Tableau 18 : Concentration de siderophores produites avant l'addition du sérum humain.....	98

Tableau 19 : *Concentration de siderophores produites après l'addition du sérum humain.....101*

Tableau 20 : *Aspects macroscopique des pigments sur le milieu King B.....103*

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Répartition du fer dans l'organisme	14
Figure 02 : Cycle du fer dans l'organisme	15
Figure 03 : Diagnostic étiologique d'une anémie	31
Figure 04 : Organes lymphoïdes secondaires.....	37
Figure 05 : Image au microscope électronique d'un neutrophile (jaune, droite) phagocytant anthrax bacilli (orange, gauche).....	40
Figure 06 : Schéma des différentes étapes de la phagocytose.....	41
Figure 07 : Un macrophage de souris avec deux grands prolongements cytoplasmiques	42
Figure 08 : Monocyte.....	42
Figure 09 : Molécules CMHI et CMH II.....	45
Figure 10 : Schéma d'un anticorps.....	47
Figure 11. Modèle de transduction du signal pour l'acquisition du fer via la ferri pyoverdine.....	56
Figure 12. Vue d'ensemble schématique des principaux systèmes de sécrétion de protéines dans les bactéries Gram négatif. Les systèmes de sécrétion de type I, III et IV sécrètent des protéines en une seule étape sans intermédiaire péri plasmique.....	60
Figure 13 : Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> en formation sur un pneumocyte (photo UMR CNRS 6522).....	
Figure 14. Cycle de formation du biofilm bactérien chez <i>P. aeruginosa</i>	61
Figure15 : siderocalin liant le fer.....	64
Figure 16 : Automate compteur de type Coulter.....	69
Figure 17 : Appareil mini vidas (ELFA).....	72
Figure 18 : Répartition des enfants anémique (N=30) en fonction de degrés de l'anémie.....	74

Figure 19 : Paramètres hématologiques déterminés chez le groupe d'étude (anémiques) et le groupe témoins (non anémiques).....	76
Figure 20: Paramètres biochimiques déterminés chez le groupe d'étude (anémiques) et le groupe témoins (non anémiques).....	77
Figure 21 : Paramètres immunologiques déterminés chez le groupe d'étude (anémiques) et le groupe témoins (non anémiques) entre les neutrophiles et les monocytes.....	78
Figure 22 : Paramètres immunologiques déterminés chez le groupe d'étude (anémiques) et le groupe témoins (non anémiques).....	79
Figure 23 : la corrélation entre les IgG et les Hb, Fer sérique, Ferritine	81
Figure 24 : types de bactéries responsables d'infection chez notre population d'étude.....	82
Figure 25 : Stratégie d'isolement et de purification des souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes (<i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	90
Figure 26 : Schéma récapitulatif du dosage des siderophores.....	91
Figure 27 : Aspect des colonies des dix premières souches sur gélose cétrimide sous une lampe UV.....	93
Figure 28 : Aspect des colonies des dix deuxième séries de souches sur gélose cétrimide sous une lampe UV.....	94
Figure 29 : Aspect des colonies des dix dernières séries de souches sur gélose cétrimide sous une lampe UV.....	95
Figure 30 : Concentration des siderophores de type pyoverdine produites par les souches testées avant l'addition de sérum humain.....	102
Figure 31 : Histogramme illustrant les concentrations des siderophores de type pyoverdine produites par les souches testées avant l'addition de sérum humain.....	102
Figure 32 : La droite d'étalonnage obtenue après la lecture de la densité optique.....	104
Figure33 : Graphe comparatif entre l'absorbance de l'étalon et notre proteine,sidérophore.....	105
Figure 34 : Concentration des siderophores de type pyoverdine produites par les souches testées après l'addition de sérum humain.....	107
Figure 35 : Histogramme illustrant les concentrations des siderophores de type pyoverdine produites par les souches testées après l'addition de sérum humain.....	107
Figure36: Graphe illustrant la cinétique bactérienne avant et après l'ajout du siderocalin..	108
Figure 37 : Aspects des colonies de la souche C33-2 sur le milieu de King B.....	110

Figure 38: <i>Aspects des colonies de la souche M30-6 sur le milieu de King B.....</i>	111
Figure 39: <i>Aspects des colonies de la souche L10-2 sur le milieu de King B.....</i>	111
Figure 40 : <i>Aspect microscopique pour la souche C33-2 après coloration de Gram.....</i>	112
Figure 41 : <i>Aspect microscopique pour la souche M30-6 après coloration de Gram.....</i>	112
Figure 42 : <i>Aspect microscopique pour la souche L10-2 après coloration de Gram.....</i>	112
Figure 43 : <i>Type respiratoire réalisé sur milieu VF des trois souches sélectionnées.....</i>	113
Figure 44 : <i>Test de catalase réalisé chez les trois souches les plus performantes.....</i>	113
Figure 45 : <i>Test d'oxydase réalisé chez les trois souches les plus performantes.....</i>	114
Figure 46 : <i>Résultat de la galerie après 24 h d'incubation réalisé sur la souche la plus performante C33-2.....</i>	114
Figure 47 : <i>Capture de fenêtre d'affichage de l'identification probabiliste de la souche C33-2 donnée par le Bacterial Identification Program.....</i>	115
Figure 48 : <i>Capture de fenêtre de la grille d'identification de Bacterial Identification Program contenant les résultats obtenus pour la souche C33-2.....</i>	115
Figure 49 : <i>Graphiques démontrants le taux optimal de source de Carbone dans la production de siderophores.....</i>	116
Figure 50 : <i>Graphiques démontrants le taux optimal de source d'Azote dans la production de siderophores.....</i>	117
Figure 51 : <i>Graphiques démontrants le pH optimal dans la production de siderophores....</i>	117

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Malgré l'amélioration remarquable des conditions du niveau de vie ces dernières décennies, la pauvreté est toujours considérée comme principale déterminant des problèmes nutritionnels dans les pays en voie de développement. En effet, la malnutrition demeure un problème majeur de sante publique en affectant la croissance physique, le développement cognitif, la reproduction et la capacité du travail physique, aboutissant à une diminution dans la performance humaine. Elle est à l'origine de beaucoup de désordres nutritionnels aussi bien chez les enfants que chez les adultes.

Les carences en micronutriment (fer, vitamine et iode) sont assez répandues dans les populations les plus défavorisées et accompagnent généralement la malnutrition protéino-énergétique.

Selon l'OMS l'anémie est le problème de santé publique le plus fréquent dans le monde, elle touche tous les groupes d'âge (**HALL ET *al.* 2001 ; PUDDLE ,2002 ; OMS /UNICEF ,2004**). L'Asie du sud-est occupe le premier rang de prévalence générale pour l'anémie chez l'enfant avec une prévalence de 60% (**HALL ET *al.* 2001 ; DE SILVA, 2003**). Le déficit en fer est la cause principale de l'anémie. Ce sont les pays en voie de développement qui connaissent les prévalences les plus élevées à raison de 60% chez les femmes enceintes, 50% chez les enfants de moins de 4ans et 45% chez les enfants d'âge scolaire (**DE SILVA, 2003**).

L'impact sanitaire de l'anémie est très important chez les adultes et les enfants. Il se manifeste par la fatigue, la perte de capacité de travail, le retard de croissance et la perturbation du développement mental et cognitif (**OSKI, 1993**).

Chez l'enfant, la carence en fer entraîne une diminution de la réponse immunitaire et donc une augmentation de la fréquence des infections causées par des bactéries pathogènes (comme les *Pseudomonas*) qui ont évolué en développant maintes stratégies en vue d'acquérir le fer qui est un élément indispensable à la vie de tout organisme vivant.

Malgré la grande abondance de ce métal dans la couche terrestre, la concentration en fer libre disponible dans les biotopes colonisés est largement trop basse pour permettre la croissance de ces micro-organismes. A l'exception de quelques micro-organismes, tels certains *Lactobacilli* (Imbert & Blondeau, 1998 ; Neilands, 1972), les agents de la syphilis, *Treponema pallidum* (Posey et al, 1999) et de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi* (Posey & Gherardini, 2000), tous les organismes vivants nécessitent du fer pour leur croissance. En effet, cet élément intervient tant que cofacteur dans de nombreux processus métaboliques tels que la synthèse des acides nucléiques (Dougherty & Downs, 2006), la photosynthèse (Okamura et al, 1975), la phosphorylation oxydative (Schafer et al, 1996), le transport et le stockage de l'oxygène, la régulation génétique ou encore le transfert d'électrons (Andrews et al, 2003 ; Wandersman & Delepelaire, 2004).

Comme il a été vu précédemment, le fer, bien qu'essentiel, est paradoxalement très peu bio disponible en raison de sa très faible solubilité à pH physiologique. Il existe principalement sous deux formes, une ferreuse, Fe^{2+} , et une plus stable, la forme ferrique, Fe^{3+} . Sous cette dernière forme, le fer est oxydé et précipite en hydroxydes de fer hautement insolubles (Braun & Killmann, 1999). Ainsi, à pH 7 et dans un environnement aérobie, les concentrations en fer libre varieront de 10^{-9} à 10^{-18} M (Griffiths et al, 1999). Néanmoins, pour une croissance optimale, les micro-organismes nécessitent une concentration en fer de l'ordre du 10^{-6} M. Ainsi, afin de surmonter cette faible biodisponibilité, les micro-organismes aérobies ont, en conséquence développé de nombreuses stratégies très efficaces pour acquérir ce métal. La méthode la plus répandue d'acquisition du fer est la production de composés hautement affins pour celui-ci et de faible poids moléculaire ($< 2500Da$) : les siderophores. (HALLBERG L et al, 1996).

Nous nous sommes intéressés à faire une étude prospective pour évaluer l'effet de l'anémie ferriprive sur l'immunité humorale et cellulaire. Un autre volet a été soulevé dans notre étude, c'est de chercher la relation entre la carence en fer, l'infection et la production des siderophores par les organismes pathogènes.

Notre travail donc s'organise en trois parties, dans une première partie bibliographique nous explorerons les effets de la carence en fer sur l'immunité chez les enfants puis, nous nous intéresserons à l'acquisition du fer par les siderophores produits par *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram négatif, pathogène opportuniste.

Dans une seconde partie nous exposerons la méthodologie de l'étude que nous avons mise en œuvre, nous présenterons les différents résultats de notre travail. Ensuite nous discuterons l'ensemble de cette étude.

Enfin la troisième partie représente une conclusion générale de la recherche

*La Partie
Bibliographique*



Chapitre I

La Malnutrition



I- MALNUTRITION

Près de 30% de la population mondiale souffre de malnutrition sous une forme ou une autre. Ceux qui ne reçoivent pas suffisamment d'aliment énergétique ou de nutriments essentiels ne peuvent pas mener une vie saine et active. Le résultat est dévastateur et se traduit par la maladie voire la mort, d'où une perte incalculable en potentiel humain et en développement social. Parallèlement, des centaines de millions de personnes dans le monde souffrent de maladies qui peuvent être attribuées à la faim, à un apport énergétique déséquilibré ou à des carences en vitamines ou en sels minéraux.

La malnutrition est un terme général qui peut être utilisé pour décrire n'importe quel désordre nutritionnel, et elle doit être définie comme une pathologie et non comme un état. Il s'agit d'une pathologie systématique aux conséquences multiples et d'étiologie toute aussi variée (**VIS ET BRASSEUR, 1997**).

Il y'a une différence entre la malnutrition et la sous alimentation. En effet, la sous alimentation concerne plus particulièrement les niveaux d'apport alimentaire et l'effet de faible apport (**MELCHIOR, 1998**).

I-1-POPULATION VULNERABLE A LA MAL NUTRITION

Le risque d'apparition de différentes formes de malnutrition varie selon le groupe d'âge et le sexe (**PELLETIER, 1993 ; FRONGILLO, 1995**)

La malnutrition touche plus particulièrement les nourrissons et les jeunes enfants, dont la croissance est rapide et peut gravement affecter leur développement physique et mental. Ils ont des besoins nutritionnels proportionnellement plus élevés par rapport à leurs taille (**RADIMER ET al, 1992 ; PELLETIER, 1993**).

I-2- LA MALNUTRITION DES ENFANTS DANS LE MONDE

L'état nutritionnel est le meilleur indicateur mondial du bien – être de l'enfant. Si de nombreuses études ont été réalisées chez l'enfant depuis les années 70, il reste difficile de surveiller les tendances de la malnutrition de l'enfant en raison du manque de comparabilité de ces enquêtes (**MILLER, 1979**).

Dans les pays en développement, la malnutrition de l'enfant, appréciée par le retard de croissance, est progressivement tombée de 47% en 1980 à environ 33% en 2000. Malgré un accroissement de la population, le nombre estimé d'enfant de moins de 5 ans ayant un retard de croissance a diminué de près de 40 millions dans ces pays pendant les 20 dernières années. Cependant les données présentées confirment que la malnutrition de l'enfant reste un problème de santé publique majeur dans les pays en développement, un tiers de tous les moins de 5 ans est atteint d'un retard de croissance. Parmi eux, 70% habitent en Asie, 26% habitent en Afrique et 4% habitent en Amérique latine. Ces estimations concordent avec celles qui ont été publiées par les fonds des nations unies pour l'enfance (2000).

I-3- CONSEQUENCES DE LA MALNUTRITION

I-3-1 -Défaut de croissance

La malnutrition protéino-énergétique inhibe la croissance. Il existe deux sortes de défauts : maigreur ou émaciation, le retard de croissance qui peut être un signe d'insuffisance chronique à long terme (IRD, 1996 ; KATONA Et *al*, 1998)

I-3-2- Difficulté d'apprentissage

Le lien entre la croissance et le développement cognitif est difficile à établir. Les études d'association chez les enfants en bas âge révèlent que la sous nutrition peut engendrer un potentiel déficitaire en matière de cognition (LIU ET *al*, 2003). En effet, on rapporte que les enfants à l'âge préscolaire de 3 ans issus des milieux urbains des îles Maurice ont des scores faibles à l'âge 11ans dans les tests de lecture, habilité spatiale et verbale indépendamment des tests psychosociaux, aussi on a trouvé une association entre la sous nutrition chronique et les scores de tests éducationnels chez des enfants scolaires vietnamiens. L'effet est plus significatif pour l'indice taille pour âge et poids pour âge, (LIU ET *al*, 2003 ; HALL ET *al*, 2002).

Certains chercheurs ont comparé les performances cognitives chez les enfants scolaires de 6 à 11 ans et ceux de 12 à 16 ans en insécurité alimentaire. Les premières ont de moins bonnes performances en arithmétique, redoublent plus, décrochent plus des psychologues, (ALIAMO ET *al*, 2001).

I-3- 3- l'insuffisance staturale

Dans les pays pauvre l'insuffisance staturale est la conséquence de précédent épisode de maladie ou de privation, elle n'est pas nécessairement due aux conditions actuelles. Cependant une petite taille n'entraîne pas de préjudice général pour l'individu, car on peut être petit et en bonne sante (BEATON, 1989).

I- 4- MALNUTRITION CHEZ LES ENFANTS EN ALGERIE

Malgré une baisse de la malnutrition chez les enfants de moins de cinq ans en Algérie, la situation est jugée préoccupante par les spécialistes (**MASSEM et al, 2010**).

-C'est ce qui ressort de l'enquête effectuée récemment par le ministère de l'Intérieur et des collectivités locales dont les résultats ont été communiqués à l'occasion de la Journée mondiale de l'alimentation. Comparée à une étude réalisée en l'an 2000, le taux de malnutrition en Algérie est passé de 28 à 18 % en sept ans, soit plus de 0,5 million d'enfants. Même si ces résultats révèlent « une amélioration » des conditions de nutrition chez cette catégorie d'enfants, ils restent loin, selon la Fondation nationale pour la promotion de la santé et du développement de la recherche scientifique (Forem), des objectifs assignés au programme mis en place par le ministère de la Santé en 2001 pour lutter contre la malnutrition. La tendance à une alimentation déséquilibrée voire à la malnutrition a souvent pour origine une pauvreté structurelle, (**MASSEM et al, 2010**).

Aujourd'hui, un enfant de moins de 5 ans sur cinq présente une malnutrition en Algérie, ce qui donne un chiffre absolu de près de 600.000 enfants dont 150.000 présentent une forme sévère de malnutrition », constate la fondation. Or, dans le programme suscité, une réduction de 50 % de la prévalence de la malnutrition protéino-calorique du nourrisson et du jeune enfant âgé de moins de cinq ans devait être enregistrée avant l'an 2004. En 2007, le taux de malnutrition en Algérie n'a pas été atteint malgré la légère amélioration constatée si l'on sait que ce même programme prévoyait une réduction de 50 % de la prévalence de la carence en fer chez les nourrissons et les enfants de moins de cinq ans, ainsi que chez la femme enceinte et l'allaitante en 2004. Il était question, également, durant cette même année, de l'éradication des troubles dus à la carence en iode et l'éradication du rachitisme chez les enfants de moins de 3 ans (**MASSEM et al, 2010**).

Le taux de 18 % se répartit à raison de 3,7 % (106.000 enfants) pour la prévalence de l'insuffisance pondérale dont 0,6 % de forme sévère, de 11,3 % (322.000 enfants) de prévalence du retard de croissance dont 3 % de forme sévère et de 2,9 % (83.000 enfants) pour la prévalence de l'insuffisance staturo-pondérale dont 0,6 % de formes sévères. Pour illustrer ce constat, la fondation donne à titre d'exemple le pourcentage d'élèves bénéficiant de la cantine scolaire qui était respectivement de 19,05 %, de 24,20 % et de 29,74 % pour les wilayas de Djelfa, M'sila et Skikda en 2004. Des données statistiques qui traduisent, explique la fondation, « une demande alimentaire insuffisamment satisfaite, en particulier chez les jeunes enfants, or on sait que les besoins en protéines animales sont très importants à cet âge. Cette situation expliquerait l'existence de foyers de malnutrition protéino-calorique en Algérie (*MASSEM et al, 2010*)

I-5 - IMPORTANCE DE LA MALNUTRITION

Dans les pays en développement (PED), pauvreté, malnutrition et insuffisance des services de santé sont à l'origine chaque année du décès de millions de personnes dont une majorité d'enfants. La plupart meurent dénutris, victimes de l'interaction entre la dénutrition et cinq ou six maladies. Évitable dont la rougeole, la diarrhée et les infections respiratoires (**TABLEAU 01**). Dans l'ensemble des pays en développement, le nombre de personnes souffrant chroniquement de sous-alimentation est estimé à 786 millions (20 %). Sur une période de 20 ans, les pourcentages ont fortement diminué sauf en Afrique (35 contre 33 %). Les mêmes tendances sont observées pour la malnutrition des enfants de moins de 5 ans (**FAO - OMS, 1992**). L'OMS estime que 230 millions d'enfants ont un retard de taille et 50 millions une maigreur (**DE ONIS et al 1993**).

D'autres formes de malnutrition, telles que les carences spécifiques en micronutriments, menacent une population qui avoisine le milliard. Les carences en fer, zinc ou vitamine A ont également un impact sur l'immunité et entraînent un risque accru de mortalité par infection (**PELLETIER, 1994**).

Tableau 01 : Mortalité liée aux infections (*en millions d'enfants de moins de 5 ans*)
(FAO - OMS. 1992).

Infections respiratoires aiguës	326
Maladies diarrhéiques	320
Rougeole	190
Paludisme	0,8
Maladies sexuellement transmissibles	0,8
Tétanos néonatal	0,4
Septicémie et méningite du nouveau-né	0,3
Autres maladies dont parasites intestinaux	0,3
Maladies pouvant être évitées par la vaccination	2,1
Tuberculose	0,3

I-6-ETAT NUTRITIONNEL, SYSTEME IMMUNITAIRE ET RESISTANCE AUX INFECTIONS

Le risque infectieux est augmenté chez les populations des PED qui vivent dans un environnement moins contrôlé et plus contaminant, surtout en zone tropicale (contamination alimentaire, approvisionnement en eau polluée, absence de collecte des déchets, assainissement insuffisant, habitat insalubre, surpeuplé, etc.). Face à un agent pathogène, l'organisme dispose d'une première ligne de défense avec la peau et les muqueuses des tractus respiratoire et gastro-intestinal considérées comme des organes lymphoïdes associés. En cas d'intrusion, l'organisme bénéficie d'une défense multiple: mécanique, chimique, bactériologique et d'un système spécifique, le système immunitaire, dont le bon fonctionnement est fortement conditionné par l'état nutritionnel (**CHANDRA, 1991**).

En cas de malnutrition, il existe une atteinte des tissus lymphoïdes associés (peau, amygdales, Bronches et intestin) caractérisée notamment par une diminution de la réaction inflammatoire et une atrophie des amygdales et des plaques de Peyer. Le plus important en terme de conséquences est l'atrophie du thymus, considéré comme un organe essentiel de l'immunité. Au niveau humoral, il existe une baisse du complément, essentiellement la fraction C3, et de substances comme le lysozyme. Parmi les immunoglobulines, seules les immunoglobulines sécrétoires sont diminuées, d'où le maintien d'une bonne réponse vaccinale (**CHANDRA, 1991**).

Au niveau cellulaire, la phagocytose ne semble pas affectée mais l'activité bactéricide est diminuée. En ce qui concerne les populations lymphocytaires, les lymphocytes B ne sont pas modifiés, il existe une diminution significative des lymphocytes T et plus spécifiquement des auxiliaires ou "helpers" (CD4) parallèlement à une augmentation des cellules "nulles" correspondant à des lymphocytes T immatures. Les monokines comme l'interféron (IFN) et les interleukines 1 et 6 (El, IL6) présentent une baisse significative, alors que les lymphokines telles le MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) et l'interleukine 2 (IL2) ne sont pas affectées (**MUÑOZ et al, 1995**), (**TABLEAU 02**).

- L'ensemble de ces processus correspond à une immunodéficience acquise secondaire à la malnutrition qui entraîne une chute du potentiel de défense et donc une moindre résistance aux infections. Le (**TABLEAU 03**) présente le degré d'influence de l'état nutritionnel sur la plupart des maladies infectieuses (**CUISINIER et al, 1985**).

Tableau 02 : Récapitulatif des effets de la malnutrition sur le système immunitaire
(CHANDRA, 1991)

Organes lymphoïdes	Thymus	↙ ↘ ↘
	Amygdales	↙
	Plaques de Peyer	↙
Peau	Hypersensibilité retardée (HSR)	↙
Immunité humorale	Complément (fraction C3)	↙ ↘
	Immunoglobulines	→
	Immunoglobulines sécrétoires	↙
	Autres substances (lysozyme ...)	↙
Immunité cellulaire	Phagocytose	→
	Bactéricide	↙
	Lymphocytes B	→
	Lymphocytes T (T4 ou helpers)	↙
	Lymphocytes T immatures	↗ ↗
Hormones thymiques	Thymuline (FTS-Zn)	↙
Cytokines	Interféron (IFN)	↙
	Interleukine 1	↙
	Interleukine 6	↙
	Interleukine 2	→
	Facteur cytotoxique (TNF ou cachexine)	→
	Facteurs de migration (MIF)	↙

Tableau 03 : Influence de l'état nutritionnel sur les maladies infectieuses

(CUISINIER ET *al.* 1985)

<i>Influence</i>	<i>Majeure</i>	<i>Variable</i>	<i>Légère</i>
Bactériennes	Tuberculose Diarrhée Coqueluche Infect. respiratoire Choléra Lèpre	Diphtérie Staphylococcie Streptococcie	Typhoïde Tétanos Toxi-infections
Virales	Rougeole Diarrhée à rotavirus Infect.respiratoire Herpès VIH	Influenza	Fièvre jaune Variole Arbovirose Poliomyélite Encéphalite
Parasitaires	Pneumocystose Parasit. intestinales Trypanosomiase Leishmaniose Schistosomiase	Giardiase Filariose	Paludisme
Mycosiques	Candidose Aspergillos		

I-7-EFFET EN RETOUR DE L'INFECTION SUR L'ETAT NUTRITIONNEL

Chaque fois que les barrières immunitaires sont franchies, divers processus biochimiques, métaboliques et hormonaux produisent un effet délétère sur l'état nutritionnel en modifiant l'équilibre entre apports et besoins. L'anorexie provoque une diminution des ingesta et la malabsorption réduit encore la quantité de nutriments absorbés. Parallèlement, les besoins sont augmentés suite à la synthèse accrue de protéines spécifiques (inflammatoires, immunoglobulines etc.) et à l'hyperthermie qui augmente le métabolisme basal. Cette baisse des apports et l'augmentation des besoins entraînent une balance azotée négative suivie d'un déficit de la plupart des nutriments (**TOMKINS et al, 1989**).

Lorsque l'état nutritionnel initial est satisfaisant et les réserves corporelles suffisantes, l'organisme a la possibilité de réparer ses propres tissus et donne ainsi le temps au système immunitaire d'éliminer l'agent infectieux. Par contre, si l'organisme se trouve déjà dans un état de malnutrition avec des réserves corporelles insuffisantes doublé d'un état d'immunodéficience acquise secondaire à la malnutrition, l'agent infectieux surmonte plus facilement les différents mécanismes de défense de l'hôte et peut générer une infection grave et durable. C'est le danger représenté par la moindre infection opportuniste chez l'individu mal nourri, à l'instar de ce que l'on a constaté plus récemment chez les sujets infectés par le VIH. L'organisme entre alors dans une série de cercles vicieux, qui constitue une véritable spirale morbide et explique le taux élevé de mortalité liée au complexe "malnutrition-infection" (**SCRIMSHAW et al, 1971**).



Chapitre II

Le fer dans l'organisme



II- L E FER DANS L'ORGANISME :

II-1- ROLE DU FER DANS L'ORGANISME :

La présence du fer dans l'organisme est d'une grande importance vue son rôle dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la fabrication de l'hémoglobine, et d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN (**HAMLADJI et al, 1993**).

Les formes métaboliques actives sont le fer sérique lié à une protéine, la transferrine, le fer des pigments respiratoires (hémoglobine, myoglobine, cytochromes) et les enzymes oxydatives (catalase et peroxydase), (**HAMLADJI et al, 1993**).

A l'état normal 0.6 à 1.2 g de fer sont stockés dans des réserves qui sont situés dans tout le tissu réticulo-histiocytaire de l'organisme, notamment dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Ces réserves sont sous deux formes chimiquement différentes :

- **La ferritine** : protéine cristallisable hydrosoluble. La molécule d'environ 70A° de diamètre, est visible au microscope électronique, son poids moléculaire est de 460000 Daltons. Le fer lié à la ferritine est assez rapidement mobilisable. La ferritine plasmique d'origine cellulaire ne semble pas jouer un rôle physiologique important. L'intérêt de son dosage tient dans le fait que son taux suit très fidèlement les variations du stock martial de l'organisme.
- **L'hémosidérine** : est une forme dérivée de la ferritine qui se trouve surtout dans les cellules du système réticulo-endothélial, elle est insoluble, visible au microscope optique après coloration de perls, elle contient deux fois plus de fer que la ferritine mais ne le libère que très lentement. Chez le sujet normal, il y a un échange constant entre le fer des réserves et le fer plasmatique.

Un litre de sang contient 500 mg de fer. L'organisme contient 4 à 5 g de fer répartis sous forme de composés héminiques et non héminiques :

Le fer héminique représente près de 75% de l'ensemble du capital martial de l'organisme.

-70% de fer héminique hémoglobinique.

-05% de fer myoglobinique.

-0,5% de fer enzymatique nécessaire au métabolisme oxydatif.

Le fer non héminique correspond aux formes de transport, il représente 0,1% (transferrine ou sidérophiline) et 25 à 30% sont sous forme de réserves (ferritine, hémosidérine) **(HAMLADJI et al, 1993), (FIGURE 01).**

Le fer sérique joue un rôle essentiel, car il représente la forme de transport et de *mobilisation*, le taux normal de fer sérique est de 1,2 à 2g /l.

Le fer sérique est lié à la transferrine (sidérophiline) qui est une glycoprotéine de masse moléculaire 75000 Daltons, synthétisée au niveau du foie. L'avidité de la molécule pour le fer est remarquable, elle ne cède ses deux atomes de fer sous forme ferrique, qu'à l'érythroblaste. La transferrine n'est saturée qu'au tiers de sa capacité de liaison par le fer, **(HAMLADJI et al, 1993).**

Il est difficile d'apprécier les formes de réserves, mais elle représente 25 à 30% soit 1 à 1,2g environ du fer total de l'organisme.

Le métabolisme du fer se fait en un cycle clos **(FIGURE 02)**. Les entrées et les sorties sont relativement réduites par rapport au stock total 4mg. Ils ne dépassent pas 1mg chez l'homme adulte et 1,5mg chez les femmes normalement réglée pendant la menstruation.

Les hématies circulantes, au terme de leur vie, libèrent le fer de leur hémoglobine, celui-ci, pour l'essentiel, est réutilisé pour une nouvelle synthèse de l'hémoglobine par les érythroblastes **(HAMLADJI et al, 1993).**

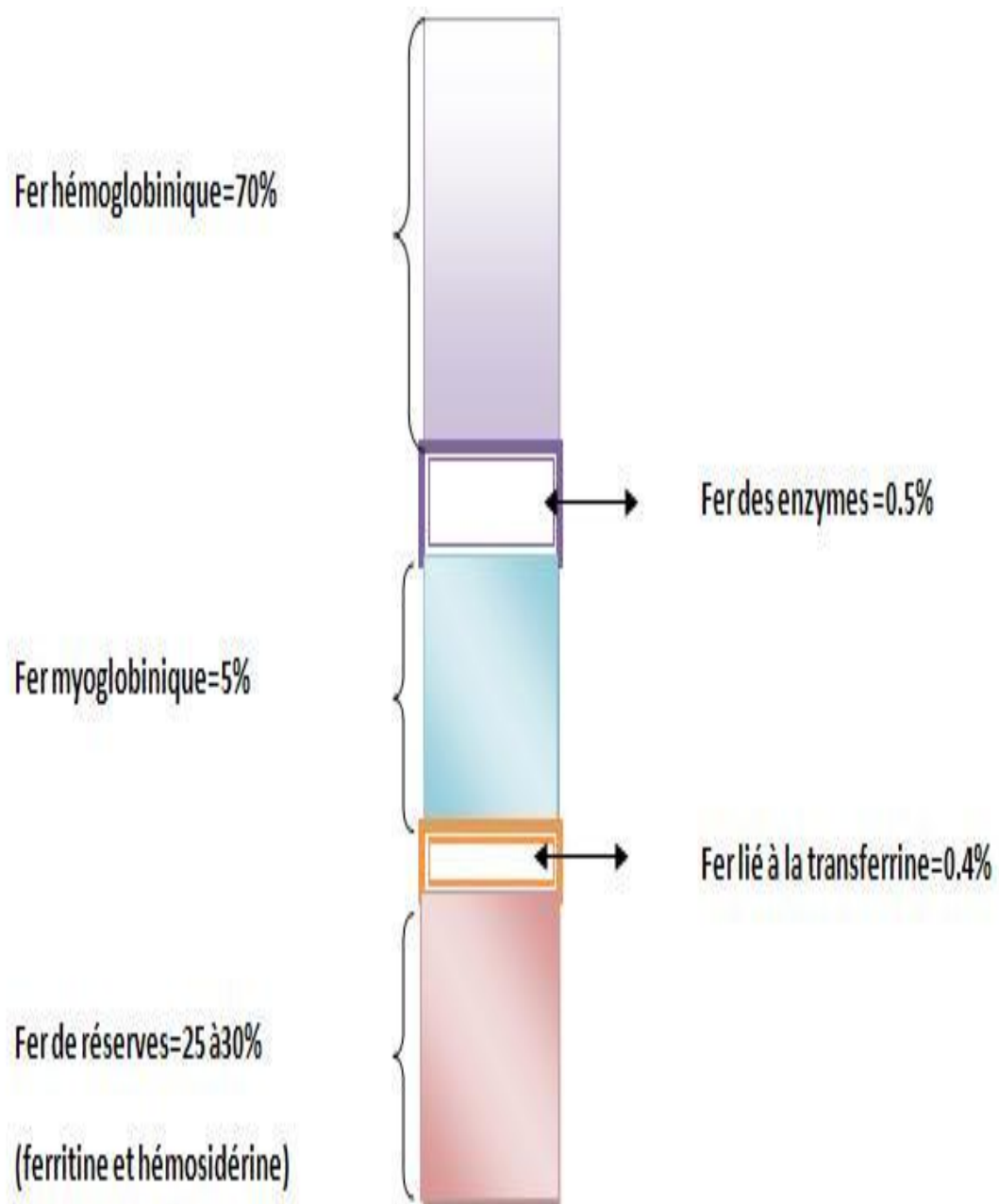


FIGURE 01 : Répartition du fer dans l'organisme (HAMLADJI et al, 1993).

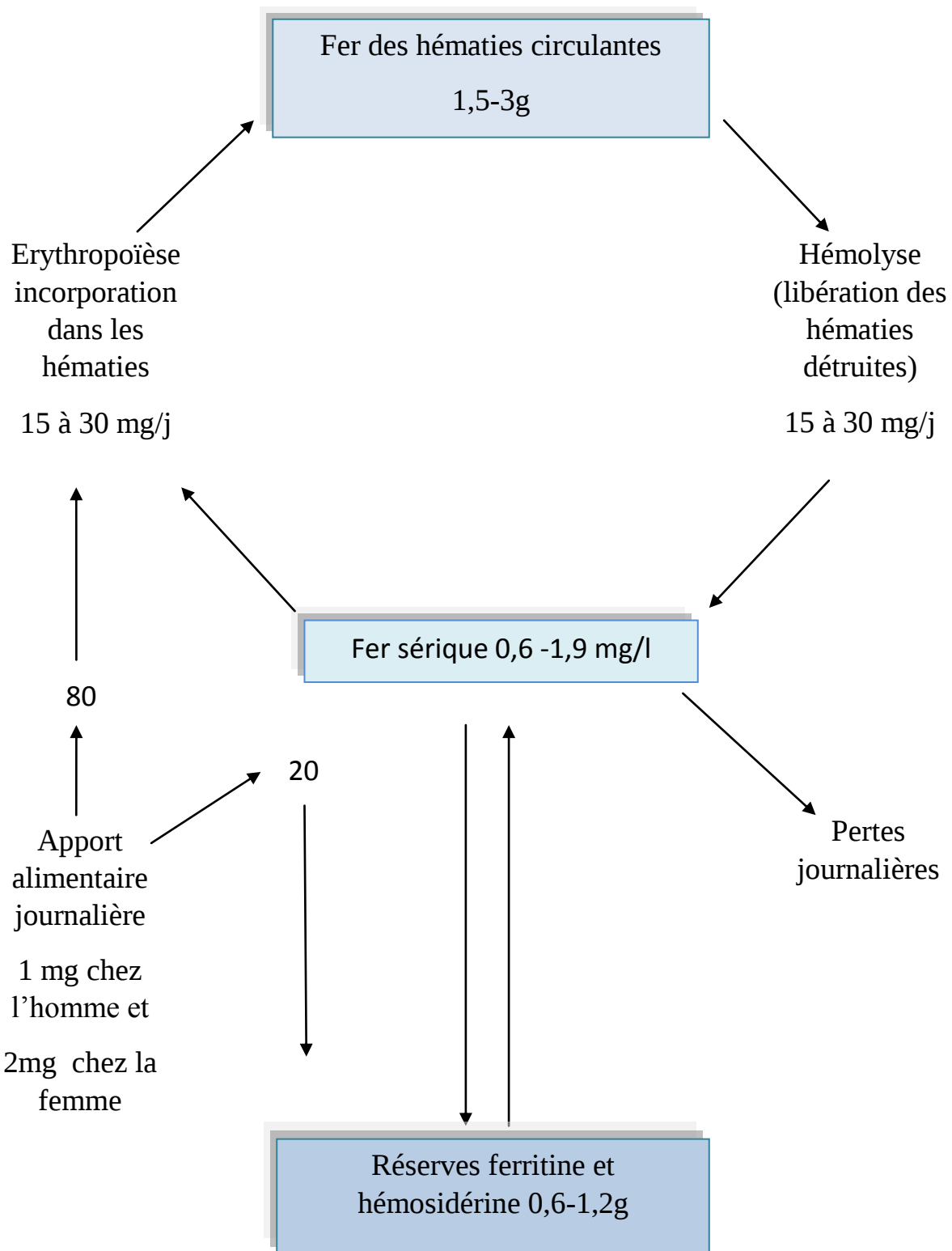


Figure 02: *Cycle de fer dans l'organisme* (CALOP et al, 2008).

II-2-LES BESOINS ET LES PERTES EN FER

II-2-1-LES BESOINS :

Les besoins quotidiens sont destinés à équilibrer les pertes, ils sont en principe largement couverts par l'alimentation (**TABLEAU 04**), (**ZITOUNI et al, 1982**).

Les besoins journaliers en fer se diffèrent selon le sexe, ainsi que l'état physiologique de la femme comme suit : Chez l'Homme adulte, les besoins en fer sont de l'ordre de 15mg (besoins quotidiennes infimes).

- Chez la Femme adulte : 18mg de fer couvriront ses besoins (besoins accrus en raison des hémorragies menstruelles).
- Chez la femme enceinte, il faut un apport quotidien de 20mg (besoins fœtaux, hémorragie de la délivrance), (**SULTAN et al, 1994**).

Tableau 04: Les besoin et les apports quotidiens en fer (mg/j) (**SULTAN et al, 1994**).

<i>SUJET</i>	<i>APPORT (MG/J)</i>	<i>BESOIN (MG/J)</i>
<i>Nourrisson</i>	10	1
<i>Enfant</i>	05	0,5
<i>Femme enceinte</i>	30	03
<i>Femme en dehors de la grossesse</i>	20	02
<i>Femme ménopausée et homme</i>	10	01

Une alimentation normale apporte quotidiennement une quantité suffisante de fer permettant de couvrir les pertes quotidiennes.

Les aliments ont une composition variable en fer (**TABLEAU 05**). Les viscères (le foie et les reins) et les muscles animaux, certains fruits (abricot, pêche, pomme, prune) et fruits secs, ainsi que les légumes frais et secs sont pourvus d'une activité antianémique. (**CALOP et al, 2008**).

Quoique le fer contenu dans les aliments d'origine animale est mieux utilisé que celui provenant des aliments d'origine végétale, (**GILBERTE, 1982**).

Le lait et farineux en sont relativement dépourvus, ce qui explique la fréquence de la carence martiale chez le nourrisson avant de passer à une alimentation diversifiée.

Tableau 05: Teneur en fer des aliments (**CALOP ET al. 2008**).

<i>Aliment</i>	<i>Teneur en fer (mg/100g)</i>
<i>Boudin noir cuit</i>	22
<i>Viande de pigeon rôti</i>	20
<i>Foie de volaille cuit</i>	10,4
<i>Cœur de bœuf cuit</i>	7,3
<i>Haricot blanc sec</i>	7
<i>Jaune d'œuf cru</i>	5,5
<i>Amande</i>	4,2

II-2-2- LES PERTES

Elles sont d'environ 1mg/j chez un homme adulte et 1,5mg/j chez les femmes normalement réglées, ces pertes se font d'une part par les fèces, excrétion biliaire et desquamation des cellules de la muqueuse du grêle, d'autre part par les urines, la sueur et la desquamation cutanéophanérienne.

En plus de ces facteurs, on note chez la femme :

Les pertes menstruelles : 70ml de sang, soit 35mg de fer par mois.

La grossesse : représente malgré l'épargne de la menstruation, une perte totale de 700mg au profit du fœtus au cours du dernier trimestre particulièrement.

L'allaitement : environ 1mg/j.

Une balance négative entre les besoins et les pertes peut s'installer dans plusieurs situations :

II-2-2-1- LA GROSSESSE :

La perte physiologique est évaluée à 700mg par grossesse, soit 1,3 litre de sang répartie entre le transfert de fer au fœtus durant le troisième trimestre et l'hémorragie de la délivrance. De plus, au cours de la gestation, il y a une stimulation de l'érythropoïèse exigeant 450 mg de fer.

C'est pour cette raison que les grossesses répétées et rapprochées sont responsables d'une carence martiale, surtout dans le cas d'une alimentation pauvre en fer, (**GILBERTE, 1982**).

II-2-2-2- LA CROISSANCE :

La masse globulaire augmente avec le poids et la taille. A la naissance, le nouveau-né ne dispose que d'une réserve de fer hépatique prélevé pendant la grossesse sur les réserves de la mère.

-En l'absence d'apport de fer alimentaire, il l'épuise en 6 mois. Ces réserves se constituent dans le troisième trimestre de gestation d'où la prédisposition des prématurés à la carence martiale, (**HAMLADJI et al, 1993**).

II-2-2-3- LA LACTATION :

Elle fait perdre à la maman 0,5 à 1mg/j de fer, mais est compensée par l'aménorrhée, (HAMLADJI *et al*, 1993).

II-3- METABOLISME DU FER

II-3-1-ABSORPTION DU FER :

L'absorption du fer se fait au niveau de l'estomac, il est essentiellement sous forme de fer ferreux. Pour être absorbé, le fer doit libérer des protéines alimentaires qu'il contient. Ceci explique que dans les grandes diminutions des sécrétions gastriques, on puisse observer une diminution de l'absorption du fer non du fait de la diminution de la sécrétion d'acide chlorhydrique mais du fait de la diminution de la sécrétion de pepsine (BERNARD *et al*, 1981).

-L'acidité gastrique permet la transformation du fer trivalent Fe^{3+} en fer divalent Fe^{2+} plus apte à l'absorption, et est susceptible de former des chélates de petites tailles facilement absorbables ; une malabsorption du fer est d'ailleurs fréquente après gastrectomie. Dans le duodénum et plus accessoirement le jéjunum, le fer passe du pôle intestinal au pôle sanguin de la cellule. Au pôle sanguin, il est fixé sur la sidérophiline qui va transporter une grande partie vers la moelle osseuse (siège de l'érythropoïèse) et l'autre partie vers le compartiment de réserves (rate, foie), (ZITOUNI *et al*, 1982).

Dans l'organisme, la partie la plus importante de fer est contenue dans les globules rouges (fer hémoglobinique 2,7g). Chaque jour 15 à 30mg de fer sont libérés par l'hémolyse physiologique des hématies et la même quantité est introduite dans les nouveaux érythroblastes mis en circulation (ZITOUNI *et al*, 1982).

II-3-2-REGULATION DE L'ABSORPTION DU FER :

Une partie seulement du fer qui a pénétré dans la cellule intestinale est délivrée à la sidérophiline, le reste demeure dans la cellule et finalement repassera avec elle dans les selles lorsqu'elle desquamera.

L'absorption est régulée par un mécanisme encore mal connu. On admet actuellement que chez les femmes enceintes, les villosités intestinales stockent le fer absorbé sous forme de ferritine et le cède selon les besoins à la transferrine plasmatique. Le mouvement est d'autant plus intense que la transferrine est plus désaturé (ZITOUNI *et al*, 1982).

Plusieurs transformations successives du fer dans le tube digestif sont nécessaires, le suc digestif dissocie le fer des complexes alimentaires. L'acide chlorhydrique gastrique maintient un pH nécessaire à l'absorption. Le fer en excès, qu'il provienne de l'alimentation ou du milieu intérieur, retombe dans la lumière du grêle lors de la desquamation des cellules épithéliales-villositaires.

L'équilibre de ce système en circuit fermé peut être rompu si les pertes sont accrues, il s'agit le plus souvent des pertes hémoglobiniques par hémorragie. Le déséquilibre apparaît d'autant plus facilement chez la femme en période génitale ou au cours de la grossesse que ses réserves sont moindres du fait des pertes menstruelles antérieure (ZITOUNI *et al*, 1982).

II-4- LA CARENCE EN FER :

II-4-1-MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES :

L'apparition d'une anémie est liée à la rupture de l'équilibre entre la production médullaire des globules rouges (érythropoïèse) et leur destruction périphérique physiologique au terme de leur vie de 120 jours (hémolyse). Trois niveaux de carence en fer ont été déterminés :

II-4-1-1- EPUISEMENT DES RESERVES DE FER :

Le fer est absent dans la moelle osseuse, le niveau de la ferritine est inférieur à 12µg/l et le pouvoir sidérophénique s'établit à plus de 400µg/l. Il n'y a pas d'effet sur le fer fonctionnel, (ZITOUNI *et al*, 1982).

II-4-1-2- CARENCE PRECOCE EN FER FONCTIONNEL :

L'apport de fer fonctionnel est sous optimal mais pas assez bas pour parler d'anémie, les mesures biochimiques indiquent que le pourcentage de saturation de la transferrine est faible et le dosage du récepteur de la transferrine du sérum est élevé, (ZITOUNI *et al*, 1982).

II-4-1-3- ANEMIE LIEE A UNE CARENCE EN FER :

L'hémoglobine est inférieure à 13g/dl chez les hommes, 12g/dl chez les femmes et 11g/dl chez les femmes enceintes (PASULT, 2002).

II-4-1-3-1-INCIDENCE SUR LA SANTE :

Les besoins en fer varient selon les personnes, la quantité de fer perdue (par exemple à cause de menstruation), la période de croissance et les quantités requises (par exemple pendant la grossesse).

Il existe un certain nombre de symptômes précoces non spécifiques. Bien que les symptômes s'appliquent à tous les âges. Nombre d'entre eux ne peuvent être déterminés que lors d'un entretien avec la personne concernée. Le **TABLEAU 06** résume les symptômes liés à une carence en fer, (PASULT, 2002).

La carence en fer, qui dans sa forme la plus sévère résulte en anémie, se traduit chez l'adulte par une diminution de la capacité physique (GARDNER *et al*, 1979). Chez la femme enceinte, les anémies sévères sont responsables de 20% des décès maternels (VITERI, 1997). Elles augmentent les risques de morbidité et de mortalité fœtale et néonatale ainsi que le risque de prématurité et de faible poids du nourrisson à la naissance (ALLEN, 1997). Les enfants anémiques sont intellectuellement moins performants et présentent des troubles du comportement (LOZOFF *et al*, 1982) et présenteraient une taille inférieure et une dynamique de croissance ralentie (FAIRWEATHER, 1992. CHWANG *et al*, 1988). La résistance aux infections et l'immunocompétence sont diminuées (BERGER *et al*, 2000).

**Tableau 06 : les symptômes physiques et cliniques lors d'une carence en fer
(PASULT, 2002)**

SYMPTOMES PRECOCES	SYMPTOMES PHYSIQUES	MANIFESTATION NON HEMATOLOGIQUE
-fatigue	-Pâleur	-fonction cellulaire et croissance altérées
-maux de tête	-fatigue	
-irritabilité	-difficulté à respirer	-développement et fonction cognitives
-dépression	-capacité de travail réduite	-pronostic fœtale altéré et accouchement prématuré
	-résistance réduite aux infections	

II-5-RESISTANCE A L'INFECTION

Il est de mieux en mieux établi que l'anémie et la carence martiale peuvent jouer un rôle dans la capacité de l'individu à résister à l'infection. La défense contre les micro-organismes dépend dans une large mesure de l'activité phagocytaire des globules blancs qui ingèrent et détruisent les bactéries envahissant un organe ainsi que d'un enchainement complexe d'événements qui entraînent l'apparition d'une immunité humorale et cellulaire. C'est ainsi que les granulocytes détruisent les bactéries grâce à l'activité de leur enzyme cytoplasmique myéloperoxydase associée à un mécanisme de production de peroxyde d'hydrogène (KLEBANOFF, 1971). Cette activité enzymatique est quelque peu réduite en cas d'anémie ferriprive et redevient normale après administration de fer (HIGASHI et al, 1967. CHANDRA, 1973). Il se peut qu'une telle diminution de la myéloperoxydase puisse amoindrir la résistance de l'hôte, comme permettent de le supposer certaines études faites sur les rats en sevrage carencés en fer et exposés à Salmonella Typhimurium (BAGGS et al, 1974).

La carence martiale peut également amoindrir la réponse immunitaire. Ainsi, on a constaté que chez des rats en servage carencés en fer la réponse immunitaire humorale à l'administration d'anatoxine tétanique était nettement amoindrie (NALDER, et al, 1972). Dans une autre étude, on a constaté chez des patients souffrant de carence martiale une altération de la transformation des lymphocytes et de la production du facteur d'inhibition de la migration (JOYNSON et al, 1972). Certaines constatations incitent également à penser que chez l'homme la carence martiale réduit la résistance de l'épithélium de la peau et de la muqueuse à la colonisation par des organismes tels que ceux du genre *Candida* (HIGGS et al, 1972).

Les études épidémiologiques qui visent à établir un lien entre les taux d'infection et la prévalence de l'anémie sont difficiles à interpréter mais certaines constatations incitent à penser que l'anémie ferriprive peut prédisposer les enfants aux infections respiratoires (MACKAY et al, 1966). D'autre part, lors d'une étude faite récemment en Afrique orientale on a constaté une augmentation du nombre des accès de paludisme chez les malades souffrant d'anémie ferriprive à qui l'on avait administré du fer (HIGASHI et al, 1967).

Toutefois, ce phénomène peut avoir été provoqué par l'augmentation des réticulocytes consécutifs à l'administration de fer plutôt qu'à un effet stimulateur direct du fer administré sur la croissance des parasites, (HIGASHI et al, 1967).

II-6- GENERALITES SUR L'ANEMIE :

Le globule rouge, ou hématie, transporte l'hémoglobine qui est la molécule de transport de l'oxygène. Ce globule rouge a une durée de vie moyenne de 120 jours. Chez un sujet normal, la production et la destruction physiologique des globules rouges sont en équilibre, l'organisme produit autant de globules rouges qu'il en détruit, (DUTRAC, 2000).

L'anémie ne survient que par la rupture de cet équilibre, soit par augmentation de la destruction ou de la perte des globules rouges, soit par diminution de la production. La production des globules rouges est essentiellement assurée par la moelle des os, leur destruction par la rate, Le **TABLEAU 07** montre le taux de l'hémoglobine fixé selon l'OMS, (CHEVALIER et al, 1995).

Tableau 07: Définition de l'anémie (d'après l'OMS) (CHEVALIER et al, 1995)

<i>L'âge</i>	<i>Taux d'hémoglobine</i>
6 mois à 6 ans	11g/100ml
6 ans à 14 ans	12g/100ml
Adulte de sexe masculin	13g/100ml
Adulte de sexe féminin	12g/100ml
Femmes enceintes	11g/100ml

Selon l'anomalie principale, production ou destruction, on peut classer les anémies en deux groupes :

II-6-1- LES ANEMIES AREGENERATIVES : (CENTRALES)

Ces anémies traduisent l'insuffisance de la production de la moelle osseuse, la baisse ou la non augmentation de certaines formes de globules rouges dites formes jeunes en sont les témoins, le taux normal des réticulocytes est 120×10 par litre. Les anémies arégénératives se subdivisent en 3 formes :

II-6-1-1-LES ANEMIE MICROCYTAIRES ET HYPOCHROMES :

Les anémies microcytaires sont très répandues dans le monde, elles se traduisent par un volume globulaire moyen inférieur à 80 femtolitres, et ces globules rouges contiennent peu d'hémoglobine (CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine $< 31 \text{g/dl}$), (DUTRAC, 2000).

Elle se définit par un défaut de production de l'hémoglobine ou les réserves martiales sont très diminuées voir presque inexistantes, Il ya un déséquilibre entre l'absorption et l'utilisation du fer. Sa gravité est très relative car elle est en fonction de l'état des réserves martiales et du taux d'hémoglobine (ANONYME, In EL MIR, 2002).

Parmi ces anémies c'est le taux de fer sérique qui permet de les distinguer :

II-6-1-1-1-LE TAUX DE FER SERIQUE ET LA FERRITINE EST DIMINUE :

Le fer sérique est diminué ($<11\mu\text{mol/l}$) et la Ferritine est aussi diminué ($<30\mu\text{g/l}$) : C'est un déficit en fer dit (déficit martial).

Ces anémies s'accompagnent par fois d'une langue dépaillée, et d'ongles en cupules, mais cela est très rare.

Parmi les causes de ces anémies on distingue :

- Chez les femmes en dehors de la ménopause, des règles abondantes et des maternités nombreuses peuvent expliquer la carence en fer dans la plupart des cas.

- Chez les femmes ayant des règles normales ou ménopausées et chez les hommes. Il faut d'abord penser à un saignement digestif qui ne se manifeste pas. L'obsession doit être le cancer de l'estomac ou du colon.

- Des dons de sang répétés, peuvent aggraver une carence en fer, en particulier chez les femmes encore réglées.

- Les saignements de nez à répétition sont des causes exceptionnelles d'anémies hypochromes microcytaires.

- En l'absence de saignement, une anémie hypochrome microcytaires doit évoquer un défaut d'apport en fer, ou une augmentation des besoins, ce qui est le cas des périodes de croissance chez l'enfant, de la grossesse chez la femme ou d'allaitement. Il faut encore évoquer un trouble de l'absorption du fer par le tube digestif ce qui est le cas chez les personnes ayant subi l'ablation d'une partie de l'estomac.

- Chez le nourrisson c'est souvent un défaut d'apport en fer car l'importance des besoins du nourrissons en fer est très nette, plus particulièrement chez les nourrissons fragiles : prématurés ou jumeaux. (**DUTRAC, 2000**).

II-6-1-1-2-LE TAUX DE FER SERIQUE EST DIMINUE MAIS LA FERRITINE EST NORMALE OU AUGMENTE :

Dans ce cas, il s'agit d'une séquestration du fer dans les cellules réticulaire, qui traduisent une inflammation. En règle générale la vitesse de sédimentation globulaire est augmentée, ce qui traduit l'inflammation, et cette situation d'anémie inflammatoire se rencontre dans la plupart des infections chroniques, dans les maladies Inflammatoires rhumatismales et dans certaines maladies du sang.

Le traitement de ces anémies inflammatoires dépend du traitement de la cause lorsqu'elle est découverte, est possible, le fer est dans ce cas inefficace.

II-6-1-1-3-LE TAUX DE FER SERIQUE EST NORMAL OU AUGMENTE :

Dans ce cas l'anémie est liée à un trouble de l'utilisation du fer par la moelle osseuse c'est le cas de certaines anémie héréditaires. En particulier les thalassémies qui se voient chez les sujets du pourtour méditerranéen, chez qu'il manque un gène permettant la constitution de l'hémoglobine normale.

C'est aussi le cas des intoxications chronique par le plomb, contenu dans certains revêtements muraux, l'anémie prenant alors le nom «d'anémie saturnine».

Dans ces anémies, le fer ne peut être un traitement correct, la vitamine B₆ peut apporter des bénéfices, (DUTRAC, 2000).

II-6-1-2- LES ANEMIES MACROCYTAIRES

(Volume globulaire moyen >100 femolitres).

Ces anémies sont liées à des anomalies de la fabrication de l'hémoglobine et la majorité en sont secondaires à une carence vitaminique.

Les vitamines en causes sont l'acide folique ou vitamine B₉ et la vitamine B₁₂, ces deux vitamines étant essentielles à la fabrication de l'hémoglobine (DUTRAC, 2000)

Il faut noter que la concentration plasmatique en vitamine B₉ est de 5 à 15 mg/L, et 20 fois plus élevée dans les globules rouges (WAJCMAN et al, 1992).

▪ **Carence en vitamine B₁₂ : l'anémie de Biermer**

Cette anémie très particulière est liée à un déficit d'un facteur présent dans l'estomac perturbant l'absorption de la vitamine B₁₂. Elle comporte souvent un syndrome digestif avec des troubles digestifs et parfois une langue douloureuse et dépaillée. Dans certains cas s'y associent des signes neurologiques comportant notamment des douleurs des membres.

-L'étude de l'absorption digestive de la vitamine B₁₂ par ingestion de vitamine B₁₂ permet de comprendre s'il s'agit d'un déficit en facteur de l'estomac ou au contraire d'une carence de l'apport alimentaire en vitamine B₁₂ (DUTRAC, 2000).

▪ **Carence en acide folique : (vitamine B₉)**

C'est souvent une carence d'apport en vitamine B₉ qui est confirmée dans certaines situations, notamment l'alcoolisme et la cirrhose par une diminution du taux de l'acide folique dans le sang et dans les globules.

En dehors de ces trois causes principales ; des anémies à grands globules rouges se voient également au cours de certains traitements chimiothérapeutiques pour la prise en charge des cancers (DUTRAC, 2000).

II-6-1-3- LES ANEMIES NORMOCYTAIRES NORMOCHROMES

Elles se traduisent par une simple baisse du taux d'hémoglobine sanguine.

Une fausse anémie, par augmentation du volume global du sang circulant, peut induire aussi en erreur : c'est le cas de grossesse, par exemple.

En dehors de ces cas bien particuliers, une anémie de cette nature à globules rouges normaux, impose de réaliser une étude de la moelle osseuse par prélèvement de moelle (myélogramme, le prélèvement de moelle se faisant habituellement au niveau de la moelle du sternum. Il s'agit d'étudier les capacités de formation des globules rouges par la moelle.

Dans certains cas, assez rares mais assez sérieux, il s'agit d'une insuffisance médullaire complète, qui se traduit par une diminution du nombre de toutes les cellules sanguines formées par la moelle, les globules rouges bien sur, mais aussi les autres cellules sanguines, globules blancs, neutrophiles et plaquettes du sang.

Les causes de ce type d'anémie sont nombreuses et variées depuis les intoxications par certains médicaments : sulfamides, chlorate de potassium, colchicine, sels d'or, certains anti-inflammatoires, les toxiques chimiques (benzène, toluène, solvant, colle), les insecticides et certaines causes infectieuses très rares.

Ce type d'anémie implique également l'envahissement de la moelle par certains cancers ou certaines maladies malignes du sang (**DUTRAC, 2000**)

II-6-2- LES ANEMIES REGENERATIVES :(PERIPHERIQUES)

Elles se traduisent par une élévation des réticulocytes, forme jeune des globules rouges dans le sang.

- A. cette régénération se voit normalement comme séquelle et guérison après une hémorragie importante.
- B. la destruction aigue des globules rouges (hémolyse aigue)

C'est souvent un accident brutal avec pâleur, jaunisse, frissons, douleur abdominale, sérum foncé, urines noirs, possibilités de choc avec impossibilités de formation des urines (anurie).

Mais l'anémie par destruction des globules rouges peut s'installer de façon moins bruyante toujours accompagnée d'un certain degré de jaunisse (**GOTTRAND et al, 1999**).

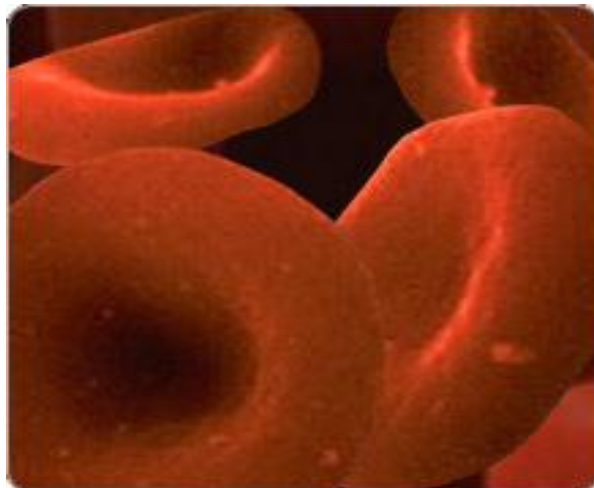
II-6-2-1-LES ANEMIES HEMOLYTIQUES CHRONIQUES :

Elles associent d'autres symptômes à la pâleur, toujours une légère jaunisse, une augmentation du volume de la rate. La durée de vie des globules rouges est diminuée et peut être précisée par des épreuves spécialisées. Cette destruction chronique avec durée de vie des globules rouges plus courte que la normale se voit dans des symptômes héréditaires à transmission génétique. C'est aussi le cas de certaines anémies dues à la destruction des globules rouges par des anticorps fabriqués par l'organisme contre ses propres constituants (anémies



Chapitre III

L'anémie de la carence en fer chez l'enfant



III-1-BESOINS EN FER CHEZ LES NOURRISSONS ET LES ENFANTS

A la naissance l'enfant à terme a un stock total en fer de l'ordre de 75 mg/kg, et présente une polyglobulie en rapport avec une activité érythropoïétique intense. Chez le prématuré, le stock rapporté au poids reste comparable, mais la quantité totale de fer de l'organisme est plus faible (**PARIS et al. 1991**). Après la naissance, va s'installer dans un premier temps une dépression de l'érythropoïèse sur huit semaines environ, avec une chute du taux d'hémoglobine de l'ordre de 1 g/dl/semaine. Cette dépression de l'érythropoïèse permet une économie de fer qui est sauvegardé sous forme de stockage, (**PARIS et al. 1991**).

Dans un 2ème temps, après la 8^{ème} semaine, on observe une réascension du chiffre de réticulocytes, témoignant d'une reprise de l'activité érythropoïétique qui reste intense, permettant de maintenir le taux d'hémoglobine stable autour de 12 g/dl pendant la 1ère année. Pendant cette première année, où les apports de fer sont limités, les stocks de fer s'amenuisent. Les besoins journaliers sont entre 4 et 12 mois de l'ordre de 0,8 mg/jour. La vitesse avec laquelle le stock va s'épuiser dépend du stock de fer à la naissance et surtout de l'apport postnatal en fer, (**BAYNES, 1996**).

Pour faire face à ces besoins en fer, l'organisme doit puiser dans son alimentation la quantité nécessaire. Le fer ainsi absorbé, après passage de la muqueuse intestinale, va se répartir en trois pools :

- Pool d'utilisation
- pool de stockage constitué par le fer fixé à la ferritine.
- pool de régulation

Ainsi, sur le plan biologique :

- le dosage de ferritine permet d'apprécier le stock global de l'organisme.

La concentration en fer sérique mesure la quantité de fer présent dans le plasma, lié à une protéine de transport, la transferrine, dont on peut apprécier le coefficient de saturation, calculé en divisant la concentration de fer sérique par la capacité de fixation de cette transferrine (**VERNET ET al, 1981**).

On peut donc comprendre que l'anémie par carence martiale se déroulera en trois étapes :

- la 1ère correspond à la dépression en fer : les réserves sont nulles mais l'apport de fer aux érythroblastes est suffisant. Seul est modifié le taux de ferritine, abaissé.
- la 2ème étape correspond à la diminution de l'érythropoïèse. Elle est marquée par une diminution du fer sérique, une élévation de la capacité de fixation de la transferrine, et une diminution du coefficient de saturation de la transferrine (VERNET ET *al*, 1983).
- la 3ème étape enfin correspond à l'anémie ferriprive avec une chute du taux d'hémoglobine.

L'anémie apparaît donc finalement comme un fait tardif dans un processus progressif de dépression en fer (SEBAHOUN, 1998). (FIGURE 03)

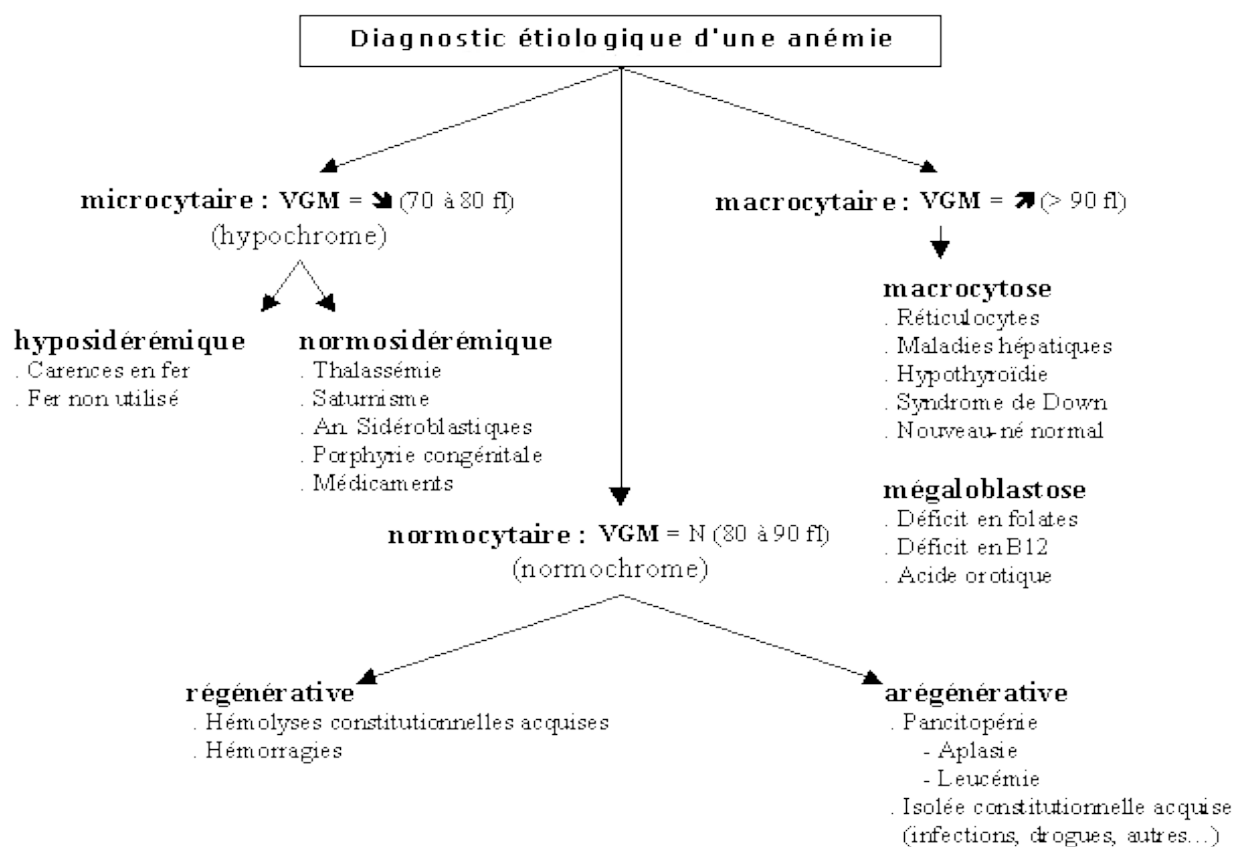


FIGURE 03 : diagnostic étiologique d'une anémie (SEBAHOUN, 1998)

III-1.1 BESOINS PHYSIOLOGIQUES AUGMENTES :

- la prématurité : la prévention doit être systématique
- périodes de croissance rapide : deux premières années et période pubertaire.

III-1.2 CARENCES D'APPORT ET DIMINUTION DE L'ASSIMILATION :

-Régime pauvre en fer : erreurs de régimes. La supplémentation des laits en fer est nécessaire. Toutefois, il semble y avoir un déplacement de l'anémie ferriprive de la première année vers la deuxième ou troisième année.

- Malabsorption : syndrome cœliaque, chirurgie gastrique, pica, entéropathie au lait de vache.

III-1.3 LES HEMORRAGIES :

Il s'agit souvent d'hémorragies chroniques, 2 ml de sang éliminent 1 mg de fer (BOTHWELL ET *al*, 1979).

-Hémorragies survenant chez le fœtus avant la naissance, pendant l'accouchement ou en période néonatale, œsophagite, maladie chronique de l'intestin, ulcère, polypes, angiomes.

- parasitoses intestinales : ankylostomes, schistosomes.

- facteurs de saignement : médicaments, troubles chroniques de l'hémostase, varices œsophagiennes, épistaxis et hématuries récidivantes, règles abondantes.

- Iatrogènes : prélèvements itératifs, en particulier chez les petits enfants.

III-1-3-1-diagnostic de la forme typique des carences martiales du nourrisson

On est amené à découvrir une carence martiale soit lors d'un examen biologique systématique, soit devant des manifestations cliniques d'intensité variable (LEJEUNE et *al*, 1998)

III-1.4. L'INTERROGATOIRE

Précise les antécédents concernant le déroulement de la grossesse, l'état à la naissance et les conditions de vie et d'alimentation.

III-1.4.1 LES SIGNES CLINIQUES

Ces signes cliniques dépendant de l'importance et de la durée de la carence :

- la pâleur est un signe habituel, isolée dans les formes modérées ou associée à d'autres symptômes dans les formes plus graves.

- altération de l'état général : asthénie, anorexie, tristesse, apathie ou irritabilité, perte de poids.

- tachycardie, souffle systolique, lipothymies, vertiges, dyspnée d'effort en cas d'anémie sévère (**LEJEUNE et al, 1998**).

- fièvre liée à des infections traînantes et répétées, notamment pulmonaires et ORL.

- troubles gastro-intestinaux en rapport avec une entéropathie exsudative et des défauts de sécrétion des enzymes digestifs.

- hépatomégalie et splénomégalie : modérées et inconstantes.

- ongles fins et cassants : atrophie des papilles de la langue; inflammations des gencives, de l'anus et du vagin. Ceci est exceptionnel chez l'enfant et souvent le fait de poly carences en vitamines ou oligoéléments, d'apport ou d'absorption, (**LEJEUNE et al, 1998**).

III-1.4.2 LES SIGNES BIOLOGIQUES

Pour affirmer le diagnostic, il faut tenir compte des variations des paramètres érythrocytaires en fonction de l'âge (**TABLEAU 08 ET 09**).

TABLEAU 08: Valeurs normales de la numération des globules rouges en fonction de l'âge
(THOMAS et *al*, 2002).

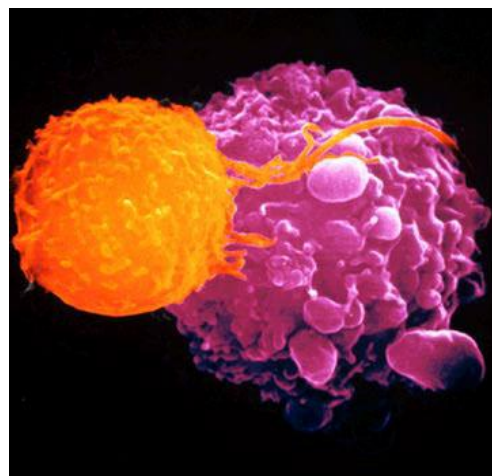
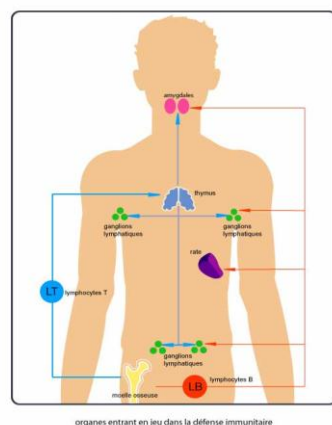
	Nouveau-né	3 mois	1 an	3-6 ans	10-12 ans
Globule Rouges (millions/mm ³)	5,2 + 1	4 + 0,8	4,4 + 0,8	4,8 + 0,7	4,7 + 0,7
Hémoglobine (g/100 ml)	17,2 + 2,5	11,5 + 1,5	12 + 1	13 + 1	13 + 1,5
Hématocrite (%)	54 + 8	38 + 6	39 + 6	40 + 4	41 + 4
VGM (μ³)	102 +10	96 + 5	78 + 8	81 + 8	84 + 7
TCMH(Pictogrammes)	33 + 4	29 + 5	27 + 4	27 + 3	27 + 3
CCMH (%)	33 + 2	33 + 2	33 + 2	33 + 2	33 + 2

**TABLEAU 09 : Valeurs normales et pathologiques de la ferritine et du fer sérique
(THOMAS et al, 2002).**

	Normale	Carence	Carence	Carence
	6 mois - 2 ans	pré-latente	latente	manifeste
Ferritine (ng/ml)	30	20	10	< 10
Capacité totale de la fixation de la sidérophiline (g/100 ml)	330 + 70	360	390	410
Saturation de la sidérophiline (%)	35 + 15	30	< 15	< 10
Fer sérique (g/100 ml)	95 + 30	95	< 60	< 40
Globules rouges	normaux	normaux	normaux	microcytose puis anémie

Chapitre IV

Le système immunitaire



IV-1-DEFINITION

L'immunologie est la branche de la biologie qui s'occupe de l'étude du système immunitaire. Apparu très tôt dans l'échelle de l'évolution, ce système a évolué pour discriminer le soi du non-soi. Les réactions de défense de l'organisme face à un organisme pathogène-quelle que soit la nature de celui-ci, virus, bactérie, champignon ou protozoaire, les maladies auto-immunes, les allergies et le rejet des greffes forment l'aspect médical de cette science. Les mécanismes de synthèse et de maturation des anticorps, d'activation du système du complément, la mobilisation et la coordination des cellules de défense, forme l'aspect fondamental et mécanistique de cette science (**JAMBON et al, 1981**).

- Les déficits immunitaires sont le plus souvent révélés à l'âge pédiatrique

Mais ils peuvent aussi être révélés à l'âge adulte. L'organisme est en équilibre dynamique permanent entre :

- Les agents infectieux étrangers (qu'on doit reconnaître comme ennemi) et éjecter.
- Toutes les cellules du soi non conservées.

C'est le système immunitaire qui est responsable de cet équilibre fait par le système hématopoïétique, la rate, les ganglions et d'un système lymphoïde associé aux muqueuses ORL, respiratoires et aux muqueuses digestives. Il y a du tissu lymphoïde associé aux muqueuses ORL qui s'appelle BALT (Broncho-pulmonaire Associated lymphoïde tissu) et digestif GALT (tous les lymphocytes que l'on a dans les muqueuses, les plaques de Peyer au niveau intestinal). Il y a du système immunitaire périphérique (la rate, les ganglions et MALT) par opposition au système immunitaire central (moelle osseuse, thymus et foie chez le fœtus) (**JANEWAY, et al, 2001**).

IV-2- SYSTEME IMMUNITAIRE

Le système immunitaire d'un organisme est un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance et de défense qui discrimine le « soi » du « non-soi ». Ce qui est reconnu comme non-soi est détruit, comme les pathogène : virus, bactérie, parasite, certaines particules ou molécule « étrangères » (dont certains poissons). Il est responsable du phénomène de rejet de greffe (Dr. ALADJIDI, 2010).

De nombreuses espèces, dont les mammifères, utilisent la variante décrite ci-après. Les principaux effecteurs du système immunitaire sont les cellules immunitaires appelées leucocytes (ou globules blancs) produites par des cellules souches, au sein de la moelle osseuse rouge (GOLDSBY et al, 2000). (FIGURE 04)

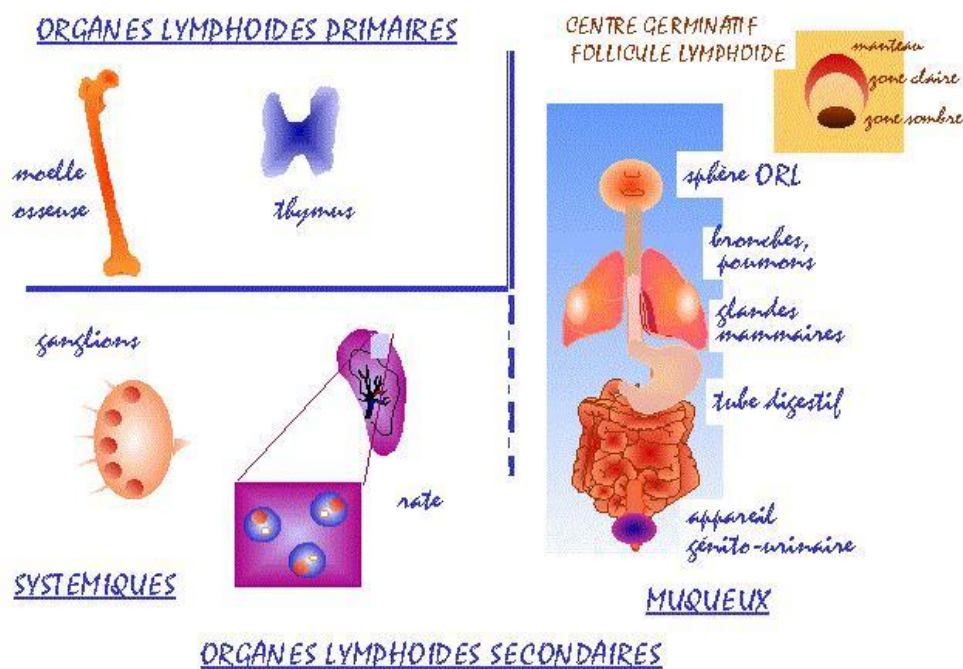


Figure 04: organes lymphoïdes secondaires (GOLDSBY et al, 2000).

Il existe deux types de mécanismes de défense :

1. Les mécanismes de défense non-spécifique ou innée ou naturelle, comme la protection de la peau et les muqueuses, l'acidité gastrique, les cellules phagocytaires ou les larmes;
2. Les mécanismes de défense spécifique, comme l'action dirigée des lymphocyte et la production d'anticorps spécifiques, (GOLDSBY et al, 2000).

IV-2-1-MECANISMES DE DEFENSE :

-L'organisme se défend contre les dysfonctions de ses cellules et les agressions, (BRADLEY et al, 1996) c'est-à-dire des processus qui ont pour conséquence de détruire des êtres vivants. Ces agressions peuvent revêtir différentes formes :

1. Les agressions dites physico-chimiques :

- Mécaniques : frottements, chocs, chutes, etc.
- Facteurs climatiques : altitude, changement brusque de température, rayonnements, sécheresse, poussières, etc.
- Agression par des agents chimiques (acides, bases, etc.) ou autres éléments (aluminium, etc.).

2. Les agressions par d'autres êtres vivants :

Un organisme constitue en effet pour un autre organisme un endroit idéal pour le développement de ses propres cellules et aussi pour un certain nombre de micro-organismes qui pourraient y proliférer, il s'agit alors d'une infection (BRADLEY et al, 1996).

Les agresseurs dans ce cas peuvent être :

- des virus
- des bactéries
- des champignons
- des levures
- des helminthes
- des arthropodes
- des prions

IV-2-2- MECANISMES DE DEFENSE NON-SPECIFIQUE

IV-2-2-1-BARRIERES PHYSIQUES :

- La peau(ou tissu externe).
- Les muqueuses(ou tissus continus).
- Les cellules possèdent enfin divers systèmes « passifs » de défense chimiques et biochimiques (enzymes, acides gras, acide lactique, flore intestinale, pH du corps...), (LUKE et al, 2005).
- Les barrières naturelles qui isolent tous nos organes de l'environnement pour nous protéger des microbes pathogènes (bactéries, virus, champignons

IV-2-2-2- CELLULES PHAGOCYTAIRES

Les leucocytes phagocytaires (qui capturent puis digèrent les microbes) sont à :

- 80% des granulocytes neutrophiles.
- 5% des monocytes, qui se transformeront par la suite en macrophages.
- 1,5% des granulocytes éosinophiles (**PRADELIZI et al, 1984**).

❖ PHAGOCYTOSE

Elle a été découverte par Elie Metchnikoff, zoologiste et biologiste russe (**1845-1916**) qui reçut le prix Nobel de physiologie et de médecine pour cette découverte.

Elle consiste en la capture et l'ingestion des particules solides inertes ou vivantes du milieu ambiant. Elle concerne en général des éléments solides, contrairement à la pinocytose (autre type d'endocytose), et ne sert uniquement qu'à des leucocytes et Polymorphonucléaires neutrophiles (éléments du système immunitaire), (**JANEWAY et al, 2001**). (**FIGURE 05**)

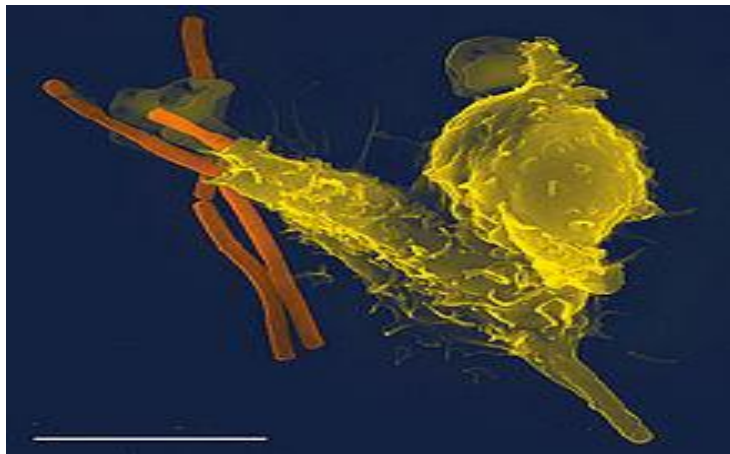


Figure 05 images au microscope électronique d'un neutrophile (jaune, droite) phagocytant anthrax bacilli (orange, gauche), (**JANEWAY et al, 2001**).

❖ FONCTIONS

La fonction de **phagocytose** est partagée par deux variétés de cellules appartenant à la famille des leucocytes (ou globules blancs):

- les polynucléaires neutrophiles
- les monocytes macrophages

Les neutrophiles sont les premiers à se rendre sur le lieu de l'inflammation. Dans les heures qui suivent, ce sont les monocytes qui parviennent au sein du foyer inflammatoire (JANEWAY *et al*, 2001).

❖ LES ETAPES DE LA PHAGOCYTOSE :

➤ L'ADHÉSION:

C'EST L'ETAPE AU COURS DE LAQUELLE LA MEMBRANE DE LA CELLULE PHAGOCYTAIRE ADHERE A LA PARTICULE QU'ELLE VA INGERER (L'HARMATTAN, 1994).

➤ L'INGESTION

On a cru longtemps que la phagocytose se produit par invagination (repli) de la membrane autour de la particule et une formation secondaire d'une vacuole de **phagocytose** ou phagosome. On sait maintenant que la particule phagocytée est entourée par les pseudopodes de la cellule (L'Harmattan, 1994).

➤ La digestion

À l'intérieur de ce phagosome, le devenir de la particule peut être de trois types:

- la digestion consécutive à l'accolement et à la fusion des lysosomes avec la membrane du phagosome constituant ainsi un phagolysosome duquel les divers enzymes vont se déverser et, selon leur spécificité, s'attaquer aux divers constituants de la particule ou du micro-organisme.
- la persistance est observée avec les particules difficilement biodégradables.
- la multiplication intra-cytoplasmique (relatif à l'intérieur du cytoplasme), qui est le propre de certaines variétés de parasites ou de virus, de bactéries responsables d'infections particulièrement virulentes comme la brucellose et la tuberculose (L'Harmattan, 1994).

➤ REJET

La phagocytose s'accompagne le plus souvent d'une brutale élévation de la consommation cellulaire en oxygène.

Pendant l'étape de digestion, il y a l'activation de lysosome constituant ainsi un phagolysosome. Les divers enzymes vont se déverser et, selon leur spécificité, s'attaquer aux divers constituants de la particule ou du micro-organisme pour la digestion totale (L'Harmattan, 1994). (FIGURE 06)

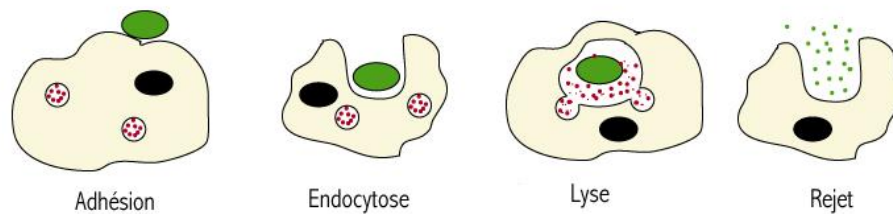


FIGURE 06: SCHEMA DES DIFFERENTES ETAPES DE LA PHAGOCYTOSE (L'HARMATTAN, 1994).

❖ MACROPHAGE

UN MACROPHAGE EST UNE CELLULE VIVANTE DANS LES TISSUS, PROVIENT D'UN GLOBULE BLANC SPECIFIQUE APPELE MONOCYTE ET VIT DANS LES TISSUS. LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES SONT DES PHAGOCYTES ET PARTICIPENT A LA FOIS DANS LES DEFENSES NON SPECIFIQUES (IMMUNITE INNEE) ET LES DEFENSES SPECIFIQUES (IMMUNITE ACQUISE) (CHARLES ET AL, 2001). (FIGURE 07).



Figure 07 : Un macrophage de souris avec deux grands prolongements cytoplasmiques, (CHARLES et al, 2001).

❖ LES MONOCYTES :

Les monocytes sont des cellules sanguines de la famille des leucocytes (globules blancs) qui évoluent en macrophages (**CHARLES et al, 2001**). (**FIGURE 08**).

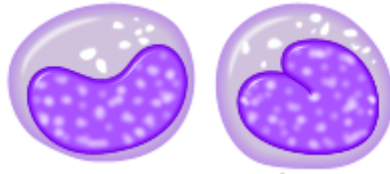


FIGURE 08: les Monocytes (**CHARLES et al, 2001**).

IV-3- REACTION INFLAMMATOIRE

Les 4 signes de l'inflammation sont: rougeur, chaleur, douleur et œdème :

1. La chaleur et la rougeur sont dues à la vasodilatation (augmentation) des capillaires et au ralentissement de la circulation du sang
 - La douleur est due à la pression des fibres nerveuses
 - L'œdème dû à l'exsudation du plasma
2. La réaction inflammatoire :
 - réaction vasculaire
 - réaction cellulaire
3. Les phagocytes et lymphocytes T cytotoxiques :
 - les leucocytes phagocytaires
 - les lymphocytes T cytotoxiques
4. Les protéines antimicrobiennes (défense humorale), (**JANEWAY et al, 2001**).

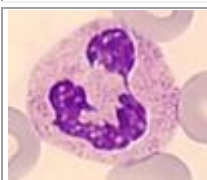
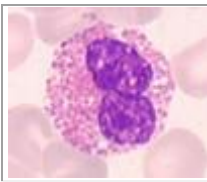
IV-4- SYSTEME LYMPHATIQUE

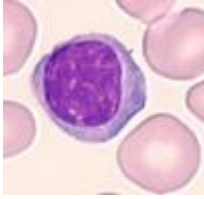
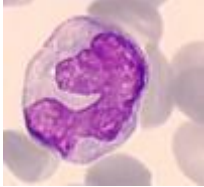
Les leucocytes (**TABLEAU 10**) passent la majeure partie de leur temps hors du système circulatoire, et patrouillent dans le liquide interstitiel des cellules où se déroulent la plupart des luttes contre les agents pathogènes. Certains macrophages résident en permanence dans les organes (poumons, foie) ou dans le système lymphatique (**JANEWAY et al, 2001**).

Le système lymphatique comprend divers organes (thymus, moelle osseuse, rate, amygdales appendice et ganglions lymphatiques) qui jouent un rôle important dans le système immunitaire.

Les capillaires lymphatiques drainent une partie du liquide interstitiel qui baigne les tissus. Le liquide, alors appelé lymph, finit par retourner dans la circulation sanguine via le canal thoracique. Sur son parcours, la lymphe traverse de nombreux ganglions lymphatiques dans lesquels tout agent pathogène rencontre des globules blancs (**L'Harmattan, 1994**).

Tableau 10 : les différents types des leucocytes (L'Harmattan, 1994).

	Nom	% des leucocytes totaux	Fonction principale
	Granulocytes neutrophiles	40-70%	Phagocytose des bactéries
	Granulocytes éosinophiles	1-4%	Destruction des vers parasites
	Granulocytes basophiles et mastocytes	0.5-1%	Libération de médiateurs chimiques (réaction inflammatoire)

	Lymphocytes B	20-45%	Production d'anticorps (réponse humorale)
	Lymphocytes T		Attaque des cellules infectées (réponse cellulaire)
	Monocytes	4-8%	Phagocytose (les monocytes se transforment en macrophages dans les tissus)

IV-5- MECANISMES DE DEFENSE SPECIFIQUE

1. Spécificité
2. Reconnaissance du soi et du non-soi :

❖ Le **soi** d'un individu est défini par des récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, nommé HLA chez l'Homme) présents sur la membrane de ses cellules, associés aux fragments peptidique qu'ils présentent (**BERGER et al. 2000**)

Chaque cellule est divisée en compartiments dont la position et la forme sont fixées par les molécules qui se fixent à son cytosquelette. La position des différentes protéines au sein de chaque compartiment ainsi que leur forme est programmée directement ou indirectement par le patrimoine génétique exprimé par chaque cellule. L'action, la position et les flux de toutes les molécules de chaque compartiment sont alors précisément gérés par l'activité enzymatique des protéines ainsi réparties (**BERGER et al.2000**).

❖ Le **non-soi** d'un individu est défini par des récepteurs cellulaires ou toute autre molécule différente du soi et ainsi reconnus comme étrangers par notre organisme. Le non-soi déclenche une réaction immunitaire. La reconnaissance du non-soi se calque sur celle du soi, y compris au sein des liquides circulant extracellulaires, lymphatiques, veineux, artériels (**LUKE ET al, 2005**).

IV-5-1-COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE :

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) désigne en immunologie un système de reconnaissance du soi présent chez la plupart des vertèbres. Les molécules du CMH sont à la surface des cellules présentatrices de l'antigène et qui assurent la présentation de l'antigène aux lymphocytes T afin de les activer. Chez l'être humain, on parle de HLA (REINHERZ *et al*, 1981). (FIGURE 09)

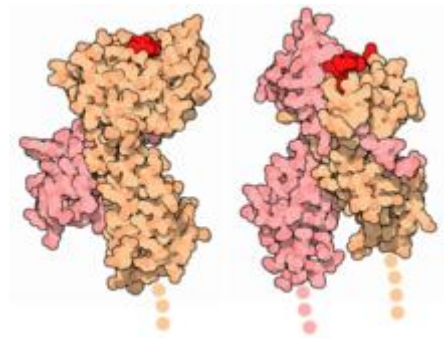


Figure 09: Molécules CMH I et CMH II (REINHERZ *et al*, 1981).

❖ CMH I :

Le CMH I est une molécule retrouvée de façon quasi-ubiquitaire à la surface des cellules nucléées de notre organisme (il est présent dans toutes les cellules nucléées sauf les hématies et les cellules germinales).

❖ CMH II :

Le CMH II est une molécule retrouvée à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) dites « professionnelles » (car n'exercent que ce rôle) telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes B activés, les macrophages (CHARLES *et al*, 2001).

Les molécules du CMH II présentent les peptides aux lymphocytes T auxiliaires (LT CD4).

IV-6-SYSTEME IMMUNITAIRE HUMORAL

Le système immunitaire humoral agit contre les bactéries et les virus dans les liquides du corps humain (tels que le sang en sécrétant des substances susceptibles d'aider à la destruction des agents pathogènes- historiquement le sang et la lymphe étaient nommés les humeurs du corps). Ses principaux moyens d'action sont les immunoglobulines, aussi appelées anticorps, produites par les plasmocyte qui sont "l'évolution" des lymphocytes B (B car les lymphocytes B ont été découverts chez l'oiseau dans la "Bourse de Fabricius") , à la suite de la reconnaissance par certains de leur récepteur membranaire d'interleukine (molécule chimique permettant le clonage des LB et leur différenciation) produite par les lymphocytes T4 (**KEUSCH et al, 1977**).

IV-6-1-LYMPHOCYTE B

Les lymphocytes B ou cellules B, également appelés bursocytes, sont des lymphocytes qui ont pour rôle de fabriquer des immunoglobulines appelées anticorps: ils sont donc responsables de l'immunité humorale. Ces lymphocytes possèdent bien plus de vésicules de Golgi, qui permettent de fabriquer des anticorps en masse, afin de neutraliser efficacement les antigènes. Les plasmocytes sont donc des lymphocytes B activés et capables de produire des anticorps dirigés contre l'antigène activateur (**L'HARMATTAN, 1994**).

IV-6-2-ANTICORPS

Un anticorps est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les antigènes de manière spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B : les plasmocytes (**GOLDSBY et al, 2000**).

Les anticorps constituent l'immunoglobuline principale du sang, aussi on utilise parfois le terme immunoglobuline à la place du mot anticorps (**JANEWAY et al, 2001**).
(FIGURE 10)

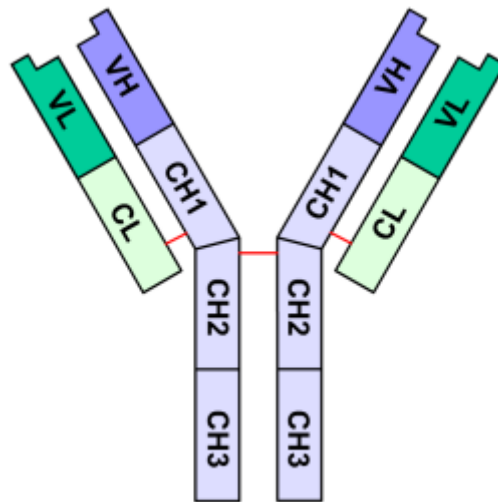


Figure 10 : Schéma d'un anticorps (JANEWAY et *al*, 2001).

IV-6-2-1-ROLE DES ANTICORPS

Au cours de la réponse immunitaire, les anticorps ont trois fonctions principales : se lier à l'antigène, activer le système du complément et recruter des cellules immunocompétentes.

IV-6-2-2-LES DIFFERENTES IMMUNOGLOBULINES

LES IMMUNOGLOBULINES SONT DES SUBSTANCES FABRIQUEES PAR L'ORGANISME DESTINEES A SE DEFENDRE CONTRE LES AGRESSIONS DES MICROBES. C'EST CE QU'ON APPELLE EGALEMENT LES **ANTICORPS** . ELLES SONT FABRIQUEES PAR LES **GLOBULES BLANCS** (CHARLES ET *AL*, 2001).

- Les IgA : elles sont fabriquées par les cellules de défense situées dans les **muqueuses** . C'est pourquoi on les trouve surtout dans les sécrétions au niveau des orifices et des canaux : le nez, la gorge, la **trachée** , les **bronches** (DAVID et al, 2006-2007).
- Les IgD : elles interviennent dans l'immunité pour aider les **lymphocytes** à agir contre les **agents infectieux** (CHARLES et *al*, 2001).
- Les IgE : elles jouent un rôle essentiel dans la **réaction allergique** en provoquant la libération d'histamine par les cellules de l'immunité (SCHLESINGER et *al*, 1974).
- Les IgM : ce sont les immunoglobulines envoyées en première intention quand un agresseur pénètre dans l'organisme. Ces molécules sont en quelque sorte les fantassins de l'immunité (CHARLES et *al*, 2001).

- Les IgG : elles interviennent soit lorsque l'agresseur n'est pas éliminé directement par les IgM, soit lors d'un deuxième contact avec ce même agresseur. Ce sont donc les molécules mémoire de l'immunité (DAVID et al, 2006-2007).

IV-7-SYSTEME IMMUNITAIRE CELLULAIRE

Le système immunitaire cellulaire s'occupe des cellules infectées par des virus, bactéries, et les cellules cancéreuses. L'action s'effectue via les cellules T, aussi appelées lymphocytes T (T parce que ces cellules mûrissent dans le thymus après leur naissance dans la moelle osseuse). On distingue deux grandes familles de Lymphocytes T :

- les lymphocytes T cytotoxiques (T_C) reconnaissent les cellules infectées.
- les lymphocytes T Helper (T_H) qui interagissent avec le macrophage (qui ingèrent les substances dangereuses) et produisent également des cytokines (interleukine) induisant la prolifération des Lymphocytes B et T.

Aux lymphocytes T s'ajoutent aussi les cellules dites « NK » pour Natural Killers. Ces cellules sont impliquées dans une réponse entre spécifique et non spécifique, selon les situations (KEUSCH et al, 1977).

IV-7- 1-LYMPHOCYTE T

Les lymphocytes T, également appelés thymocytes ou cellules T, sont une catégorie de lymphocyte qui jouent un grand rôle dans la réponse immunitaire secondaire. « T » est l'abréviation de thymus, l'organe dans lequel leur développement s'achève.

Ils sont responsables de l'immunité cellulaire : les cellules (bactéries, cellules cancéreuses) reconnues comme étrangères (c'est-à-dire autres que celles que les cellules T ont appris à tolérer lors de leur maturation) sont détruites par un mécanisme complexe (L'HARMATTAN, 1994).

IV-7-1-1-TYPES DE CELLULES T

Il y a plusieurs types de cellules T :

- Les lymphocytes T cytotoxiques
- Les lymphocytes T auxiliaires
- Les lymphocytes T suppresseurs
- Les lymphocytes NKT



Chapitre V

L'infection à

Pseudomonas et la

production des

siderophores



V-Introduction Générale

Pseudomonas aeruginosa peut être considéré à bien des égards comme l'exemple-type des bactéries pathogènes opportunistes. Pratiquement inoffensif chez l'individu sain, ce bacille à Gram négatif de l'environnement, isolé pour la première fois par **Schroeter en 1872**, se révèle en effet redoutable chez les sujets immuno-déficients, les malades intubés-ventilés des services de réanimation ou ceux souffrant d'affections chroniques comme la mucoviscidose, la dilatation des bronches, etc... L'enquête de prévalence organisée par l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) dans les hôpitaux français en 2001 lui attribuait la responsabilité de 11% de l'ensemble des infections nosocomiales, 9,6% des infections urinaires, 9,7% des infections du site opératoire, 15,5% des infections cutané-muqueuses et 21,7% des infections respiratoires hautes et basses. Une enquête similaire réalisée en 2006 est arrivée au même constat : *P. aeruginosa* représente aujourd'hui un véritable problème de santé publique (**Stanier et al, 1966**).

Les raisons de cette situation préoccupante sont nombreuses et complexes. La multiplication des gestes médicaux invasifs comme le cathétérisme, la chirurgie ou l'endoscopie sur des patients de plus en plus fragiles (polytraumatisés, immunodéprimés profonds, cancéreux, personnes âgées...) explique en partie le succès de cette espèce saprophyte à l'hôpital. De même, la structure des établissements de soins où sont concentrés malades et soignants favorise la propagation des bactéries les plus adaptables. L'utilisation massive d'antiseptiques et d'antibiotiques tend, par ailleurs, à sélectionner un environnement microbien peu diversifié où seules les espèces les plus résistantes survivent. En tout état de cause, *P. aeruginosa* a trouvé à l'hôpital une niche écologique particulièrement favorable à son développement (**Stanier et al, 1966**).

Outre un arsenal assez impressionnant de facteurs de virulence, *P. aeruginosa* possède les mécanismes lui permettant de résister naturellement à de nombreux agents antibactériens, de coloniser les surfaces inertes et les épithéliums, de former des biofilm protecteurs. Cette capacité d'adaptation hors du commun, la bactérie le doit à la très grande taille de son génome (5 à 7 Mb, soit dix fois celle d'un mycoplasme), son extrême versatilité métabolique et sa capacité à percevoir son environnement grâce à de multiples senseurs membranaires spécifiques (**Prescott et al, 2003**).

De manière encore plus inquiétante, l'administration répétée d'antibiotiques chez des patients fragilisés (réanimation, hématologie/oncologie) ou souffrant de mucoviscidose a favorisé ces dernières années l'émergence de souches de *P. aeruginosa* résistantes à tous les antibiotiques commercialisés. Le nombre croissant de ces souches dites "toto-résistantes" fait craindre un retour à l'ère pré-antibiotique où les moyens thérapeutiques étaient presque inexistants. Cette évolution s'inscrit, par ailleurs, dans un contexte actuel peu favorable où les recherches et les innovations pharmaceutiques en matière d'anti infectieux se font de plus en plus rares. Il est admis aujourd'hui que la mise au point de nouveaux agents antibactériens doit dorénavant s'appuyer sur une meilleure connaissance de la physiologie et de la génétique bactérienne, de façon à identifier les cibles cellulaires dont l'inactivation entraînera une baisse de la pathogénicité sans pour autant imposer une pression de sélection(**Palleroni, 1984**).

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram-négatif, aérobie strict, non sporulant de forme droite ou légèrement courbée. Il mesure entre 1 et 5 µm de long par 0,5 à 1.0 µm de large. Plusieurs isolats ont démontré la capacité de croître en anaérobiose en utilisant le nitrate (NO₂⁻) comme accepteur final d'électron. Ainsi, le nitrate est réduit en nitrite de même qu'en azote moléculaire. *P. aeruginosa* est une bactérie motile grâce à la présence d'un flagelle monotriche (un seul) polaire. Cette bactérie est catalase positive et oxydase positive (**Kerr, 1994**).

❖ Contexte général

P. aeruginosa possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. Cette bactérie est capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C, ce qui en fait une bactérie mésophile. La morphologie coloniale de *P.aeruginosa*, de même que pour tout le genre *Pseudomonas*, est facilement distinctive grâce à la production de pigments verts diffusibles dans le milieu extracellulaire (**Palleroni, 1984**).

Les *Pseudomonas Spp.* sont les plus importants parmi les bactéries à Gram négatif du fait de leur capacité à produire des métabolites secondaires. Il a été démontré que ces métabolites confèrent aux membres du genre *Pseudomonas* des avantages de sélectivité dans leur milieu naturel (**Kerr, 1994**). Les membres de ce groupe sont rencontrés en grand nombre et dans différentes niches écologiques, cette distribution universelle suggère une diversité génétique et métabolique remarquable. Les *Pseudomonas spp.* Fluorescents ont développé

une multiciplité de stratégies pour inhiber ou supprimer les autres micro-organismes (**Brend et Rehm, 2008**).

V-1-Distribution environnementale

La distribution des *Pseudomonas Spp* est très large mais c'est d'abord et avant tout un organisme environnemental que l'on retrouve dans l'eau, le sol et sur la majorité des espèces végétales, incluant fruits et légumes. Notons entre autres : l'eau du robinet, les fluides d'humidification oculaires, les savons, les désinfectants, les onguents et cosmétiques. On le retrouve aussi dans les spas, bains thérapeutiques, ainsi que sur plusieurs surfaces humides comme les lentilles cornéennes, le pommeau de douche, les équipements de dialyse, les appareils d'assistance respiratoire et les cathéters. Sa large distribution et sa grande capacité de survie dans le milieu aqueux, font que cette bactérie est présente en milieux hospitaliers détenant ainsi une grande part des responsabilités des infections nosocomiales. À cause d'une implication clinique majeure, *P. aeruginosa* est certes le membre le plus étudié du genre *Pseudomonas* (**Grundmann et al. 1993**).

Pseudomonas Spp n'est, de façon générale, pas un membre de la microflore normale humaine. L'intestin en est colonisé, mais seulement suite à l'ingestion de l'organisme. La colonisation du tractus respiratoire est commune chez les patients hospitalisés et surtout lors de l'intubation. Plus longtemps le patient sera sous assistance respiratoire, plus importante sera la colonisation (**Pollack, 1990**). Le fait que l'on retrouve *Pseudomonas Spp* en milieu hospitalier conduit souvent à des bactériémies à la suite d'une exposition prolongée ou à l'infection d'une plaie post-opératoire (**Pollack, 1990**).

V-2-Le modèle *P. aeruginosa*

A l'instar de quelques autres espèces (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*...), *P. aeruginosa* représente un modèle d'étude spécifique. C'est aussi l'enjeu d'une compétition internationale intense, tant sur le plan de la recherche fondamentale que sur celui de la recherche appliquée, notamment thérapeutique. Cette bactérie est considérée, en effet, comme le paradigme des espèces environnementales pathogènes opportunistes de l'homme. A ce titre, elle intéresse des spécialistes de formations très différentes (microbiologistes, biochimistes, chimistes, structuralistes, médecins, vétérinaires, épidémiologistes, etc...) (**Stanier et al, 1966**).

Conscients du fait qu'il est plus que jamais nécessaire de réunir les compétences pour pouvoir mieux appréhender un modèle aussi complexe. Elle intéresse aussi le monde industriel pour des applications diagnostiques. Le séquençage complet du génome de la souche de référence PAO1 (**C.K. Stover et al. Nature 2000, 406 : 959-964**) et de celui de plusieurs autres isolats (PA14, 2192, C3719, PACS2) a ouvert récemment de nouvelles perspectives dans le domaine de la génomique comparative.

V-2-1-Description

Les *Pseudomonas* aérobies forment un grand assemblage des eubactéries dont la diversité semble être importante. Les *Pseudomonas* aérobies regroupent les bâtonnets à Gram négatif, mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Elles sont capables de croître à 4°C et au-dessous de 43°C. Ces chimioorganotrophes utilisent plus qu'un substrat carboné comme seule source de carbone et d'énergie et sont aérobies et leur métabolisme respiratoire utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Certains *Pseudomonas* aérobies sont des chimiotrophes facultatifs qui utilisent l'hydrogène comme source d'énergie (**Stanier et al, 1966**).

Tous les *Pseudomonas* ont un cycle des acides tricarboxyliques fonctionnel et peuvent oxyder les substrats en CO₂. La plupart des hexoses sont dégradés par la voie d'Entner Doudoroff plutôt que la glycolyse. Elles ont une catalase positive, oxydase généralement positive (**Prescott et al, 2003**). Le contenu de leur ADN est compris entre 58 et 71 moles%. La famille des *Pseudomonaceae* comprend quatre genres : *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Frateriella*, *Zoogloea*. *Pseudomonas*, le genre type de la famille des *Pseudomonaceae* caractérisé par le nombre et la variété de ses représentants, occupe une place privilégiée. Il représente le groupe le plus complexe des bactéries à Gram négatives, avec une grande similitude phénotypique avec les autres genres (**Stanier et al, 1966**).

Les membres du genre *Pseudomonas* sont des bâtonnets droits ou légèrement incurvés de 0,5 à 1,0 µm sur 105 à 5,0 µm de long. La taille et la forme varient entre les souches du genre par exemple les cellules de *Pseudomonas putida* sont ovales. Cependant, les cellules des espèces phytopathogènes dépassent 4 µm de long (**Krieg et Holt, 1984**).

La plupart des études sont concentrés sur le groupe *Pseudomonas fluorescents*, ces derniers sont caractérisés par leur capacité de produire un pigment diffusible jaune-vert, soluble dans l'eau et fluorescent sous radiation UV, le nom de ce pigment est : Pyoverdine. Ce groupe englobe *Pseudomonas aeruginosa*, espèce type du genre *Pseudomonas fluorescents* (4 biotypes), *Pseudomonas putida* (2 biotype), *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas aurofaciens* (Doodoroff et Palleroni, 1974).

V-2-2-Habitat et niche écologique

Les espèces du genre *Pseudomonas* contiennent plusieurs espèces ubiquitaires. Elles sont isolées de l'environnement (eau douce et de mer, sol, végétaux, poussières en suspension dans l'air). Certaines espèces sont fréquemment rencontrées en médecine humaine, d'autres sont des phytopathogènes. Dans certains habitats, les *Pseudomonas* représentent une minorité de microflore totale. Toutefois, leur capacité de croissance dans un milieu carencé en nutriments (impuretés dans de l'eau distillée) et certaines conditions (pH proche du neutre, températures dans l'intervalle des mésophiles) permettent de les considérer comme prédominantes (Favéro et al, 1971).

V-2-3-Nutrition et conditions de croissance

La plupart des espèces appartenant au genre *Pseudomonas* peuvent croître dans un milieu minéral contenant des ions d'ammonium ou de nitrate et un seul composé organique comme seule source de Carbone et d'énergie. Cette caractéristique est la base de la caractérisation nutritionnelle des espèces du genre *Pseudomonas* (Stanier et al, 1966).

La dégradation des composés organiques chez le genre *Pseudomonas* diffère d'une souche bactérienne à une autre. Certaines espèces comme *Pseudomonas maltophila* (*Pseudomonas diminuta* et *Pseudomonas vesicularis*) requièrent l'addition des facteurs de croissances (Stanier et al, 1966).

Les espèces du genre *Pseudomonas* sont incapables de fixer l'azote. Les membres du genre *Pseudomonas* sont tous des chimioorganotrophes dont certains peuvent se développer dans des conditions autotrophes en utilisant le CO et/ou H₂ comme source d'énergie. La température idéale de croissance pour la plupart des souches est autour de 28°C. Aucune espèce du genre *Pseudomonas* ne peut supporter les conditions acides (Stanier et al, 1966).

V-3-Taxonomie

L'étude d'un grand nombre de souches portant notamment sur les caractères nutritionnels, les voies métaboliques, les mécanismes régulateurs du métabolisme et les homologies dans les compositions d'ADN ont permis de définir les espèces et de créer des groupes (**Larpent, 1990**).

- Groupe 1 : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aureofasciens*, espèces phytopathogènes.
- Groupe 2 : *Pseudomonas mallei* ; *Pseudomonas pseudomallei* ; *Pseudomonas solanacearum*.
- Groupe 3 : *Pseudomonas acidovorans* et *Pseudomonas testosteroni*.
- Groupe 4 : *Pseudomonas diminuta* et *Pseudomonas vesicularis*.
- Groupe 5 : ce groupe comprend *Pseudomonas maltophilia* (oxydase négative) qui est groupé actuellement avec les *Xanthomonas*.

V-4-L'acquisition du fer

Une fois que le pathogène a initié le processus infectieux en adhérant à la muqueuse pulmonaire, la bactérie doit être capable de s'y multiplier et de persister à sa surface. La concentration en fer libre de l'organisme humain étant bien en dessous des besoins nécessaires à une bonne croissance bactérienne, la plupart des bactéries excrètent dans le milieu extracellulaire des chélateurs de fer, appelés Siderophores (Pyoverdine, pyochéline). Ces derniers qui entrent en compétition avec la transferrine et la lactoferrine sont ensuite récupérés par le germe sous une forme complexée (Fe^{3+}) (**Lazdunski, 1998**).

De nombreux gènes sont soumis à la régulation et le rôle central dans cette régulation est assurée par la protéine Fur, qui sous forme complexée au fer agit en tant que répresseur de l'expression des gènes soumis à ce contrôle. Actuellement, il a été montré que Fur régule au moins 24 gènes. La chélation du fer peut se faire grâce aux actions combinées des siderophores et de ses exo protéases (en particulier l'élastase). L'élastase effectue la coupure de la transferrine en petits peptides, le fer ainsi libéré se trouve chélaté par la Pyoverdine (**Frailier, 2001**). La pyochéline devient directement assimilable par la bactérie. Les protéines

de la membrane externes agissent en tant que récepteurs spécifiques pour ces complexes siderophores-Fer 3^+ . La reconnaissance se fait par la chaîne peptidique des siderophores. Le passage du fer à travers les membranes de 80 KDa. Ces membranes semblent posséder une forte affinité pour le complexe siderophores-Fe 3^+ , et le rôle de ces protéines est sans doute celui de fixer le complexe (**Frailler, 2001**).

Enfin, le fer sous forme Fe 3^+ n'est pas utilisable directement et doit au préalable être réduit en Fe 2^+ assimilable par le micro-organisme pour être libéré dans le cytoplasme. Cette transformation peut s'effectuer au moyen de réducteurs physiologiques comme le NADPH ou le FMNH₂ qui réduisent les complexes Pyoverdine. Ce-Fe 3^+ très stables en Pyoverdine-Fe 2^+ beaucoup moins stables et susceptibles de libérer aisément le fer sous forme Fe 2^+ (**Frailler, 2001**).

V-4-1-Les siderophores

Le fer est un élément essentiel à la croissance de tous les organismes vivants, mais dans la majorité des milieux, la concentration du fer bio-disponible (10^{-7} M) est largement en deçà des niveaux requis pour la croissance des bactéries comme *P. aeruginosa* (**Ratledge and Dover, 2000**). Les bactéries ont évolué en développant maintes stratégies en vue d'acquérir, transporter et rendre soluble le fer (de Fe 2^+ vers Fe 3^+). La méthode la plus répandue d'acquisition du fer est donc la production de composés hautement affins pour celui-ci: Les siderophores. Après sa sécrétion, le siderophore chélate le fer dans l'environnement extracellulaire. Le complexe moléculaire résultant, le ferri-siderophore, est ensuite transporté à l'intérieur du cytoplasme via des récepteurs membranaires spécifiques pour ces complexes. *P. aeruginosa* produit un siderophore majeur appelé pyoverdine. La pyoverdine chargée de fer est transportée via le récepteur membranaire FpvA. La pyoverdine peut également agir comme molécule de signalisation induisant la sécrétion de deux autres facteurs de virulence : l'exotoxine A et l'endoprotéase PrpL. La Figure 11 illustre bien l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* via la sécrétion de la pyoverdine. (**Guerinot, 1994**).

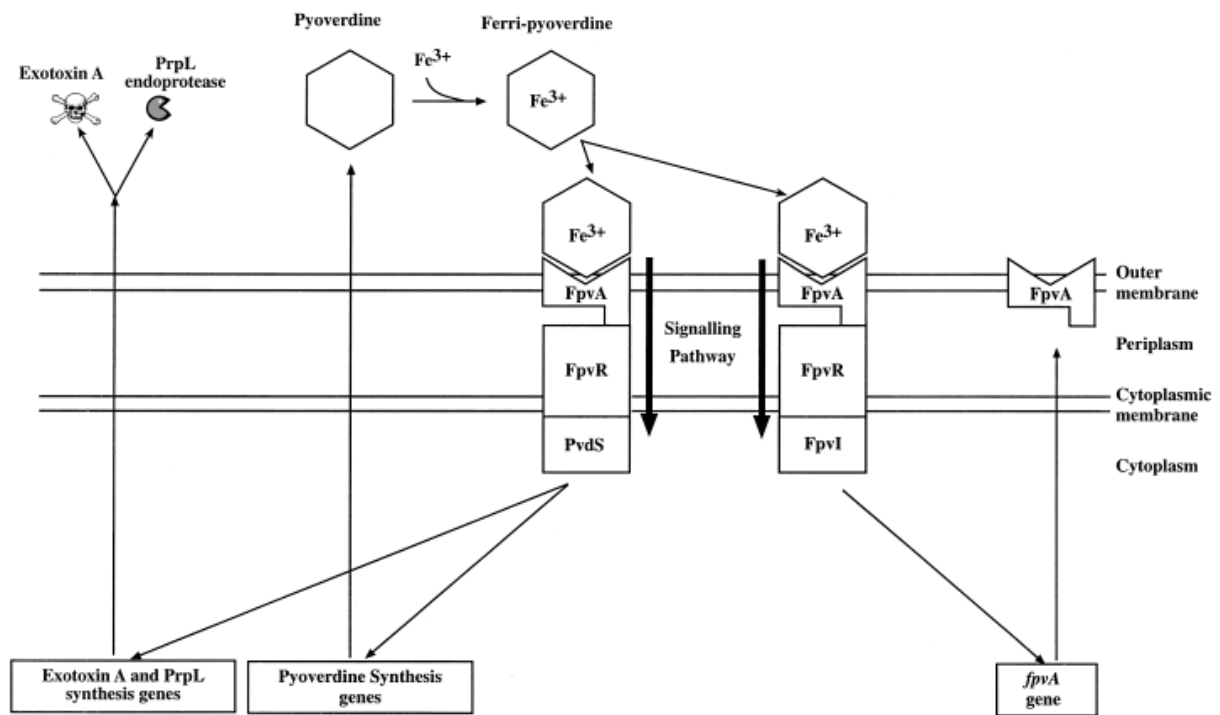


Figure 11. Modèle de transduction du signal pour l'acquisition du fer via la ferri pyoverdine (Guerinot, 1994).

V-4-2- Production de pigments hydrosolubles par certaines espèces du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas spp.* Peuvent produire des pigments diffusant dans les milieux de culture. Deux types de pigments peuvent être synthétisés : des pigments fluorescents (pyoverdines), des pigments phénaziniques non fluorescents. (Guerinot, 1994)

V-4-3-Les pyoverdines

Le pyoverdine est le terme générique d'une vaste famille de pigments jaune-verts fluorescents, solubles dans l'eau et insoluble dans le chloroforme. Leurs structure générale est celle d'un chromophore (du grec : qui porte la couleur) associé à des peptides dont la taille et la composition en acides aminés sont variables. La pyoverdine joue pour la bactérie le rôle d'un siderophores (molécule captant les ions fer ferriques). Cette capture est fondamentale

pour la croissance des bactéries, croissance nécessitant impérativement des ions de fer (**Guerinot, 1994**). La production ou l'absence de production des pyoverdines permet de classer les espèces du genre en deux groupes :

- ***Pseudomonas* du groupe fluorescent :** exemples : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. putida*, *P. plecoglossidica*, *P. simiae*, *P. syringae*
- ***Pseudomonas* du groupe non-fluorescent :** exemples : *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. fragi*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*

V-4-4-Pigments phénaziniques

Pigments phénaziniques sont une famille de molécules composées d'un noyau insaturé poly cyclique entre deux noyau benzene. Le principal pigment phénaziniques produit par certains souches de *Pseudomonas* est la pyocyanine, qui est soluble dans le chloroforme. In vivo, le pyocyanine, un joue le rôle de transporteur d'électrons dans des conditions d'anaerobioses. De plus, elle possède une activité bactériostatique sur diverses bactéries surtout à gram négatif. En solution aqueuse, la pyocyanine, est bleu. C'est en fait un indicateur de pH : Rouge en milieu acide (pH=3 environ). Bleu en milieu neutre et alcalin. Les principales espèces produisant la pyocyanine, un sont : *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P.*, *P. aureofaciens*. (**Ratledge and Dover, 1987**).

V-5-Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram-négatif opportuniste vivant normalement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et les végétaux, mais qui peut également vivre à l'état commensale sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux.

A l'hôpital, certaines souches sont plus dangereuses par leur forte densité et leur résistance due à la sélection exercée par les antibiotiques (**Livermore, 2002**). *Pseudomonas aeruginosa* est, avec les *staphylocoques* et les *entérobactéries*, la bactérie la plus souvent responsable d'infections nosocomiales telles que les septicémies, les Infections urinaires, les pancréatites et les dermatites, ainsi que les pneumonies associées aux appareils de ventilation. La colonisation pulmonaire chronique survenant chez les patients atteints de mucoviscidose s'avère souvent être la cause finale de décès (**Odeh and Quinn, 2000**).

V-5-1-Implications cliniques

P. aeruginosa est le pathogène humain le plus important du genre *Pseudomonas* étant donné le grand nombre et type d'infections causées ainsi que la morbidité et la mortalité qui leurs sont associées (**Pollack, 1990**). Il est capable de combiner efficacement adaptabilité aux milieux humides et production d'un imposant arsenal de facteurs de virulence. Les affections causées vont d'une simple infection cutanée superficielle à des septicémies fulminantes. Les infections à *P.aeruginosa* acquises en communauté chez les individus immunocompétents tendent à être localisées et sont fréquemment associées à de l'eau ou de la nourriture contaminée. Les infections causées à l'œil provoquent souvent des lésions cornéennes. Ce type d'infection est directement lié à l'usage de lentilles cornéennes. Les solutions contaminées pour lentilles ainsi que l'usage de l'eau du robinet pour l'entretien de celles-ci ont été identifiées comme sources de contamination. (**Holland et al. 1993**).

Les infections oculaires à *P. aeruginosa* peuvent rapidement mener à la formation d'ulcères de la cornée et à la perte de la vue si l'infection n'est pas traitée promptement. L'infection la plus sévère pouvant être acquise en communauté est l'endocardite provenant des seringues contaminées par les usagers de drogues injectables. Les drogues injectées sont dans beaucoup de cas mélangées avec de l'eau du robinet contaminée par *P. aeruginosa* causants la bactériémie (**Pollack, 1990**).

V-5-2-Pathogénicité et toxicité dans les infections respiratoires

Pseudomonas aeruginosa utilise plusieurs systèmes de sécrétions distincts pour injecter les Protéines toxiques qui jouent un rôle fondamental lors de l'infection. Le système de sécrétion de type II secrète des exo-produits (toxines et enzymes de dégradation) dans L'environnement proche des cellules alors que le système de sécrétion de type III délivre les toxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte (**Kipnis et al. 2006**). Les sécrétions de ces facteurs de virulence sont assujetties à des mécanismes de régulation complexes permettant à la bactérie d'adapter son phénotype au milieu dans lequel elle se trouve en formant notamment un biofilm, souvent rencontré dans les infections chroniques. Le séquençage du génome de la souche de référence PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, achevé en 2000, a révélé un vaste génome de 6.3millions de paires de bases codant pour 5570 gènes (**Stover et al. 2000**).

Parmi ces gènes, 8.4 % codent des protéines impliquées dans des fonctions de régulation faisant de cette bactérie le pathogène possédant le plus grand nombre de gènes de régulation. Des travaux comparant différentes souches de *P. aeruginosa* ont montré que son génome était relativement bien conservé mais comportait néanmoins des variations (10%) sur certaines portions codant pour des facteurs de virulence. Des études menées sur les souches de *P. aeruginosa* présentes dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose ont révélé que 20% de celles-ci présentent une forte activité de mutation, ce qui pourrait expliquer la grande adaptabilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux différents environnements hostiles ainsi que sa grande pathogénicité (**Wolfgang et al. 2003**).

V-5-3-Établir une infection chronique

Dès que la bactérie a réussi à s'implanter dans les voies respiratoires, elle devra y survivre et ce malgré la présence des défenses de l'hôte, innées et acquises, et d'évènements répétés d'antibiothérapie topique et systémique. Pour réussir ceci, *P. aeruginosa* devra développer une importante gamme de stratégies immuno-évasives incluant entre autres des protéines à action extracellulaires. Des protéases, des lipases, une phospholipase C hémolytique. La sécrétion de ces produits extracellulaires sera accompagnée par d'importants changements phénotypiques, comme la mucosité et la formation d'un biofilm, menant à une résistance accrue aux antibiotiques (**Kessler et al. 1997**).

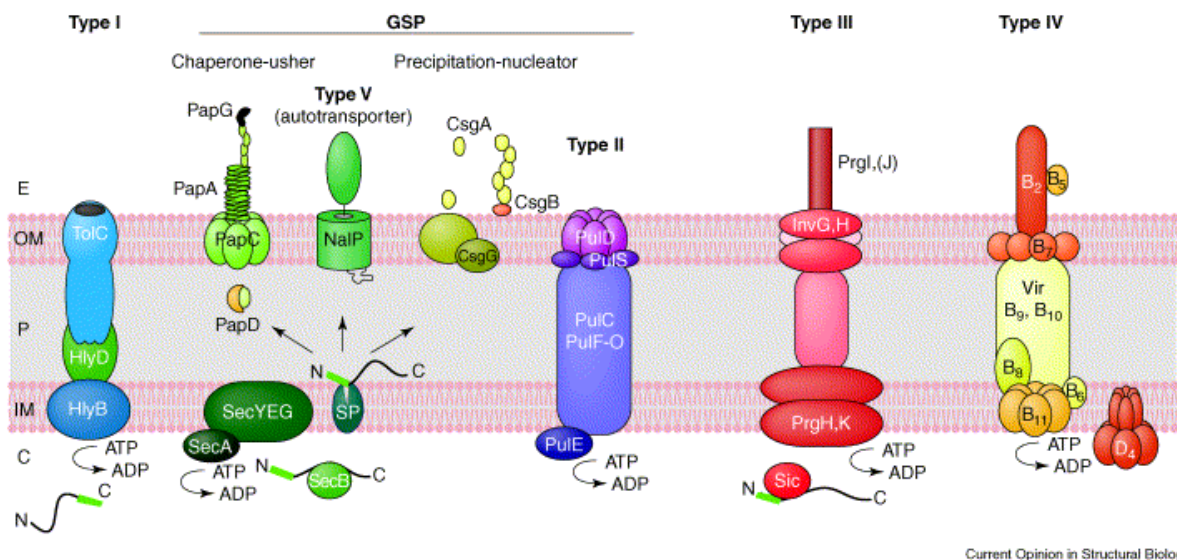


Figure 12. Vue d'ensemble schématique des principaux systèmes de sécrétion de protéines dans les bactéries Gram négatif. Les systèmes de sécrétion de type I, III et IV sécrètent des protéines en une seule étape sans intermédiaire péri plasmique. (Kessler *et al.* 1997).

❖ Les mécanismes de virulence de *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste à large spectre d'hôtes, responsable de nombreuses infections nosocomiales chez l'homme et en particulier chez les patients immuno déprimés ou atteints de mucoviscidose. Les infections générées par *P. aeruginosa* peuvent être divisées en deux grands types : les infections aiguës, caractérisées par la sécrétion de nombreuses toxines et les infections chroniques caractérisées par la formation d'une communauté bactérienne persistante organisée en biofilm au niveau du site d'infection (Frailier, 2001). Au cours des infections aiguës, *P. aeruginosa* va sécréter par l'intermédiaire de différents systèmes de sécrétion un grand nombre d'enzymes hydrolytiques, de toxines et de facteurs cytotoxiques. La virulence de *P. aeruginosa* au cours des infections aiguës est particulièrement associée au mécanisme de sécrétion de type III, dans lequel les effecteurs sont injectés directement dans le cytoplasme des cellules hôtes. Ces facteurs sécrétés vont entraîner une réponse inflammatoire sévère et une nécrose des tissus infectés pouvant provoquer une septicémie à l'issue fatale (Frailier, 2001). Lors des infections chroniques, la persistance de *P. aeruginosa* au niveau des sites d'infection est due à sa capacité à former une structure appelée biofilm. Ce biofilm est une communauté bactérienne organisée et englobée dans une matrice extracellulaire complexe. La structure et le mode de vie en biofilm offrent aux bactéries une résistance accrue face au système immunitaire de

L'hôte mais également face aux composés thérapeutiques tels que les antibiotiques. La persistance de cette communauté bactérienne au niveau du site d'infection entraîne une inflammation chronique et localisée qui conduit peu à peu à la destruction du tissu ou de l'organe sous jacent (**Frailier, 2001**).

V-5-4-Le biofilm

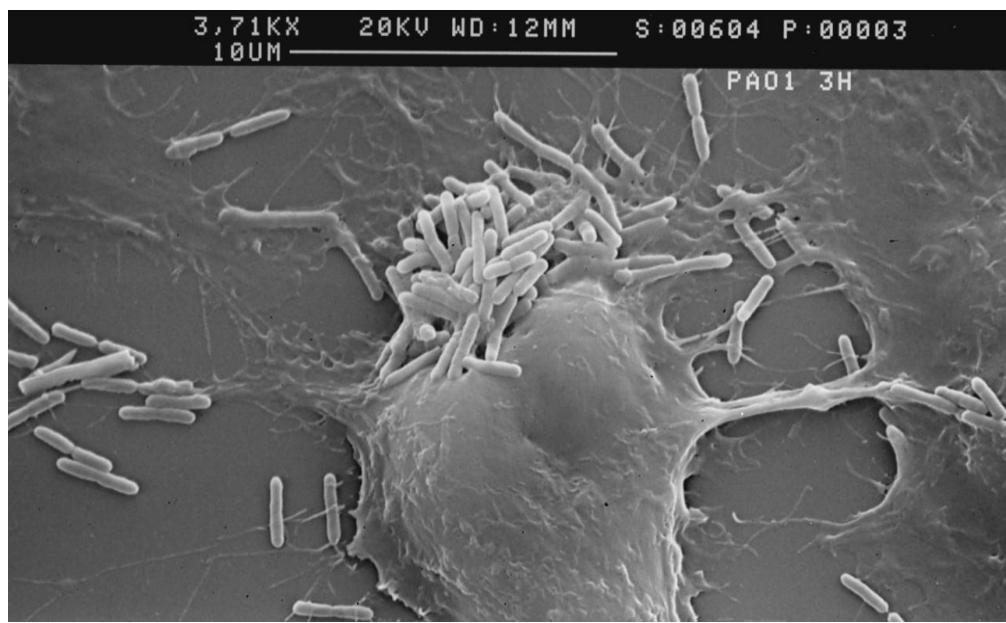


Figure 13 : Biofilm de *P. aeruginosa* en formation sur un pneumocyte (photo UMR CNRS 6522)

Une des grandes découvertes de la bactériologie de cette dernière décennie, est la mise en évidence de relations sociales entre les bactéries capables de construire de véritables communautés et de communiquer entre elles. Ces communautés bactériennes sont appelées biofilms (**Kessler *et al.* 1997**).

Un biofilm est défini comme un agrégat de micro-organismes (majoritairement des bactéries), fixés à une surface, et englués dans une gangue d'exopolymères fabriqués par ces mêmes organismes (**Costerton *et al.* 1989**). On s'accorde aujourd'hui pour affirmer que plus de 90% de l'activité microbiologique dans un écosystème (environnement aquatique, sol, corps humain,...) provient en majeure partie d'une flore sédentaire adhérant aux surfaces dans une structure de type biofilm. La présence de biofilm est de plus en plus souvent identifiée

comme la source récurrente de problèmes à la fois de santé publique, industriels et sociaux souvent lourds de conséquences et parfois dramatiques. Ces biofilms sont ainsi impliqués dans plus de la moitié des infections bactériennes chez l'homme et dans la grande majorité des infections nosocomiales. Ils sont en particulier directement responsables de toutes les Infections prothétiques. *P. aeruginosa* est la bactérie à Gram négatif la plus fréquemment rencontrée dans les infections prothétiques ; les biofilms à *P. aeruginosa* sont responsables des bronchites chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose. Si ces biofilms sont omniprésents, c'est dû à leur exceptionnelle résistance aux inhibiteurs et donc aux antibiotiques (Costerton *et al.* 1989)

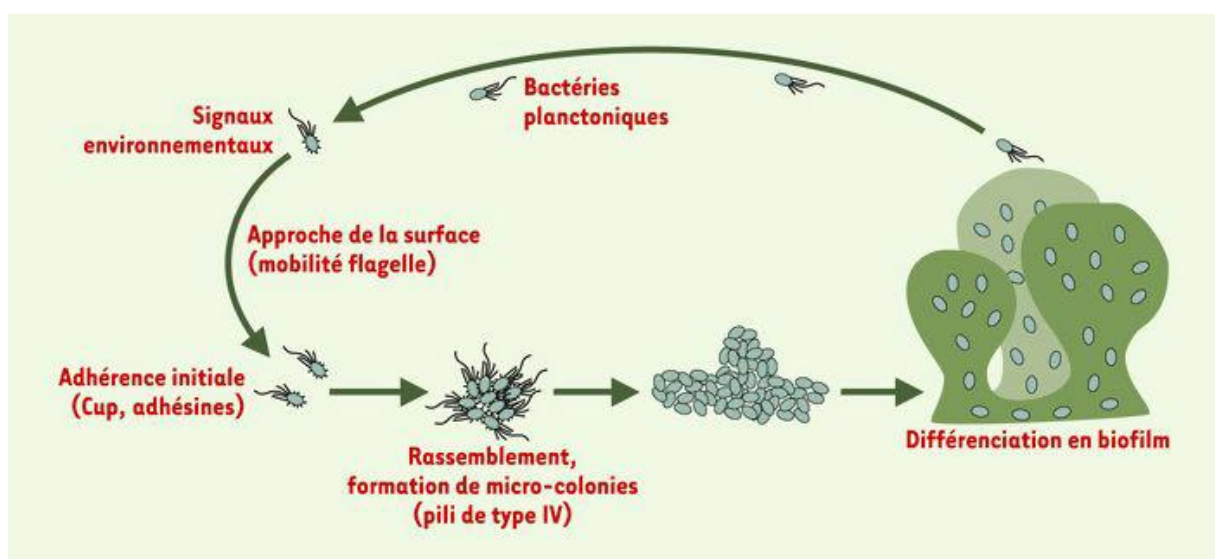


Figure 14. Cycle de formation du biofilm bactérien chez *P. aeruginosa*. (Figure tirée de Filloux et Vallet, 2003)

V-5-6-Les exo polysaccharides (EPS)

La matrice extracellulaire que constitue le biofilm se compose essentiellement d'exo polysaccharides (EPS) constituant 50 à 90% de la matière organique totale du biofilm, mais aussi de protéines et de sels. (Wingender *et al.* 1999). La nature biochimique et physicochimique des EPS dépendent largement des microorganismes concernés et des conditions environnementales (pH, salinité, température). Les EPS ont une haute masse molaire et sont très hétérogènes. Ils forment des unités répétitives de carbohydrates plus ou moins longues, pouvant posséder des ramifications, des fonctions alcool, amine, acide, ainsi que des groupements sulfate et phosphate. La forte implication de *Pseudomonas aeruginosa* dans les maladies nosocomiales fait que son biofilm est aujourd'hui l'un des plus étudiés.

Certaines études ont ainsi trouvé dans le biofilm, la présence d'alginate, un polysaccharide linéaire également produit par certaines algues brunes. L'alginate est un polysaccharide chargé négativement et qui se compose d'acides L-gulonique (G) et D-mannuronique (M) liés entre eux par des liaisons β -1,4 (**Evans and Linker, 1973**). Durant son transfert péri plasmique, il subit quelques modifications telles qu'une acétylation et une épimérisation (**Remminghorst and Rehm, 2006**). Le polymère s'organise de deux façons possibles : soit en une succession de blocs d'homopolymères, (MMM) ou (GGG), ou bien en bloc d'hétéro polymères (MGMG). (**Wingender et al. 1999**).

V-5-7-Pili et flagelle de *P. aeruginosa*

La membrane cellulaire est une structure complexe composée de divers éléments enchâssés dans la bicouche lipidique. Elle présente notamment de nombreux glycoconjugués qui sont autant de marqueurs et de récepteurs conférant une spécificité et une identité à la cellule. Ces sucres exposés ainsi à la surface sont alors la cible de protéines spécifiques capables d'identifier ces structures diverses : les lectines. Avant de s'intéresser plus particulièrement aux lectines bactériennes, rappelons que les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines pouvant être d'origine variée : virale, bactérienne, végétale ou animale. Elles sont dépourvues d'activité enzymatique, n'appartiennent pas à un système immunitaire et sont capables de reconnaître spécifiquement des oligosaccharides complexes sans les modifier (**Goldstein et al. 1980**). Elles sont souvent multivalentes, soit parce qu'elles possèdent plusieurs sites de reconnaissance par molécule, ou bien parce qu'elles s'associent en multimères, ce qui explique le fait qu'elles peuvent précipiter des polysaccharides et agglutiner des bactéries ou des cellules telles que les érythrocytes (**Goldstein et al. 1980**) .

L'adhésion bactérienne sur les tissus est souvent la première étape du processus d'infection et dans de nombreux cas, des lectines spécifiques sont impliquées dans la reconnaissance et l'adhésion aux récepteurs moléculaires exposés sur les tissus. Certaines adhésines interfèrent avec le système immunitaire, déclenchant des voies signalétiques chez la bactérie et la cellule hôte, assistant la livraison de molécules toxiques dans la cellule hôte et favorisant l'invasion bactérienne. C'est pourquoi ces protéines sont à juste titre considérées comme des facteurs de virulence et font aujourd'hui l'objet d'une attention particulière. Les lectines bactériennes connues sont associées aux fimbriae (pilis et flagelles), aux toxines, ou sont libres en solution. (**Goldstein et al. 1980**).

V-5-8-Les pilis ou fimbriae

Afin de déterminer le lieu le plus propice à leur colonisation, les bactéries ont développé une sensibilité à leur environnement proche (gradient de pH, de température, de lumière) rassemblé sous le nom de « chimiotactisme ». Pour leur motilité, certaines bactéries se sont dotées d'appendices cellulaires leur permettant de sonder la surface de la cellule hôte et se donnant la capacité de se déplacer dans le milieu. Ces organelles de surface sont respectivement les pilis et les flagelles. **(Nikaido, 1994)**

V-6-Résistance aux antibiotiques

Il est maintenant bien connu que *P. aeruginosa*, de même que les autres bactéries à Gram négatif, possède une résistance intrinsèque aux antibiotiques. Cette résistance est entre autre due à la restriction des imports à travers la membrane externe, de même que des systèmes secondaires d'efflux dépendants d'énergie **(Hancock, 1997)** donc, l'importance d'une perméabilité restreinte au niveau de la membrane externe est claire car l'utilisation d'agents qui brisent la barrière externe (comme les peptides cationiques) ou des mutations qui créent de larges pores rendent les cellules beaucoup plus susceptibles à l'antibiothérapie **(Huang and Hancock, 1996)**.

La masse d'information récemment révélée sur les systèmes à efflux de *P. aeruginosa* a permis de conclure qu'ils constituaient l'élément clé de la grande résistance intrinsèque aux drogues de cette bactérie. Toutefois, il n'existe pas de différences majeures au niveau des mécanismes d'action ou de l'efficacité des systèmes à efflux de *P. aeruginosa* (comparée à *Escherichia coli* par exemple) **(Nikaido, 1994)**. C'est plutôt la différence de perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* chiffrée entre 10 fois et 100 fois plus basse que les autres Gram-négatif **(Nikaido and Hancock, 1986)**. Il est à noter toutefois que la faible perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* n'est pas le seul facteur à considérer. En effet, elle sert également à ralentir l'entrée des drogues pour faciliter l'action des mécanismes de résistance secondaires tels que l'efflux et la dégradation de ces substances **(Nikaido, 1994)**.

V-7- Siderocalin

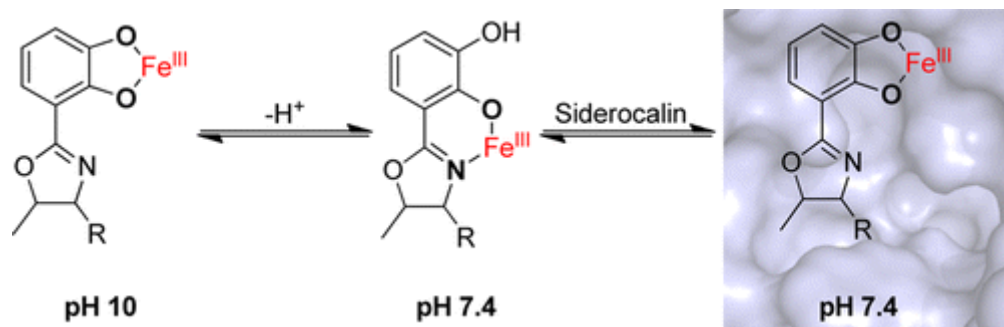


Figure15 : siderocalin liant le fer

Siderocalin (également connu sous le nom associée à la gélatinase neutrophile lipocalin (NGAL) ou lipocalin neutrophile humaine) fait partie d'une famille de protéines connues sous le nom lipocalines, qui sont de petites protéines extracellulaires qui se lient à de petites molécules hydrophobes (généralement) **(Devireddy LR, Gazin C, Zhu X et al 2005)**

Beaucoup se lient aux lipocalines rétinol (également connu sous le nom de vitamine A) et sont impliquées dans le transport du rétinol. Ce n'est que ces dernières années que la NGAL a été reconnu comme un piègeur de siderophores. Cette découverte a entraîné la nomenclature de ce composé : siderocalin (Sidero pour siderophores, calin pour lipocalin. Bien que cette protéine ait été le mieux étudié par les scientifiques cliniques, seuls quelques laboratoires étudient son métabolisme sous-jacent et la fonction des lésions tissulaires. Études structure-fonction, des études d'imagerie et des études cliniques ont révélé que NGAL.Siderocalin est un antimicrobien endogène. **(Devireddy LR, Gazin C, Zhu X et al 2005).**

Chapitre VI

PARTIE 1

MATÉRIELS ET MÉTHODES.

VI. Matériel et méthodes

VI-1-Objectifs de l'étude

La première étude vise à établir l'effet de l'anémie de la carence en fer sur le système immunitaire chez des enfants hospitalisés au niveau du service de pédiatrie (EHS) d'**Oran** canastel et le service d'immunologie de l'USTO (EHU) d'**Oran** et de chercher la probable corrélation entre les différents paramètres de statut en fer et les immunoglobulines pendant une période s'étendant de Janvier 2014 au juin 2014 et la deuxième étude effectuée au niveau du service de pédiatrie et de CCI au CHU de **Sidi Bel Abbes** pendant la période Juin 2014 j'usqu'au moi d'Octobre 2014 et a pour objectif d'établir la relation entre la carence en fer, le système immunitaire et l'infection.

VI-1-2-ÉCHANTILLONNAGE

Ont été recrutés tous les enfants reçus dans le service pendant la période d'étude et répondant aux critères de sélection. Ainsi, la population de notre étude a été comparée à un groupe de référence afin de chercher l'effet de l'anémie de la carence en fer sur le système immunitaire.

a. CRITÈRES D'INCLUSION

Enfants hospitalisés et/ou vus en consultation externe et présentant une anémie microcytaire hypochrome à l'hémogramme et une carence martiale définie par :

- – un taux d'hémoglobine inférieur à 12 g/dl, quel que soit le sexe ;
- – un volume globulaire moyen (VGM) inférieur à 80 femtolitres (fl.) ;
- – une teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) inférieure à 27 picogrammes (pg) ;
- - un taux de fer sérique inférieur à 58 µg /100ml.
- -un taux de la ferritine inférieur à 07 µg/l.

b. CRITÈRES DE NON-INCLUSION

Ont été exclus les patients :

- – transfusés au cours des quatre derniers mois ;
- – sous traitement martial ou une supplémentation en vitamine B12 ou folate depuis plus de deux semaines.

VI-3-Méthodes

VI-3-1- Préparation de l'enquête

Une enquête a été menée sur les enfants, le protocole d'étude porte sur les points suivants:
Identité de chaque enfant (nom, âge, sexe).selon **ANNEXE I**.

VI-3-2- Examen Clinique

Chaque enfant a été examiné cliniquement par le médecin à la recherche des signes évocateurs de l'anémie: asthénie, pâleur anormale de la peau et de la muqueuse, dyspnée, palpitation, vertiges.

VI-3-3-Etude biologique

➤ Prélèvement sanguin

Le prélèvement du sang a été effectué au niveau de la veine du pli du coude. La nature d'examen déterminé l'anticoagulant qui doit être utilisé dans les tubes. L'**EDTA** est l'anticoagulant de choix pour l'hémogramme. Alors que l'**HEPARINE** est l'anticoagulant pour le dosage du fer sérique et la ferritine.

➤ Numération formule sanguine

Les hémogrammes ont été déterminés sur un automate compteur de type (Coulter **NIHON KOHDEN**): Les informations recueillies sont: le nombre de globules blancs, plaquettes, globules rouges, l'hématocrite (Hte), l'hémoglobine (Hb), le volume globulaire moyen (VGM), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH).

Les anémies sont différenciées selon la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), le volume globulaire moyen (VGM) et le taux d'hémoglobine (Hb). (**FIGURE11**)



Figure16 : Automate compteur de type Coulter.

VI-4- Principe du dosage du fer sérique

Test colorimétrique photométrique pour le fer avec facteur clarifiant des lipides (LCF) méthode CAB.

Le fer (III) réagit avec le chromazurol B (CAB) et le cétyltriméthyl-ammonium bromide (CTMA) pour former un complexe ternaire coloré avec une absorbance maximum à 623nm. L'intensité de la couleur produite est directement proportionnelle à la concentration de fer dans l'échantillon. (COBAS MIRAS (RAC 042 AIND. A), (GARCIC A. ET *al*, 1979).

➤ **Mode opératoire :**

Longueur d'onde : 623nm.

Cuvette : 1cm d'épaisseur.

Température : 20... 25°C.

Lecture : Contre le blanc réactif (BR). Utiliser un seul blanc par série.

➤ **Procédure :**

Introduire dans des cuves	BR	Echantillon / STD
Echantillon / STD	---	50µl
Eau distillée	50 µl	---
RGT	1000 µl	1000 µl
Bien mélanger, incuber 15 min. à 20... 25°C. Mesurer l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon contre le blanc réactif dans les 60 min.		

VI-5- Principe du dosage de la ferritine

La méthode AxSYM Ferritine offre une procédure quantitative automatisée pour mesurer la ferritine en tant qu'indicateur clinique utile des réserves de fer dans l'organisme.

L'échantillon et tous les réactifs AxSYM Ferritine nécessaire pour une série de dosages sont pipetés par l'aiguille d'échantillonnage dans les différents puits de la cartouche de réaction (CR).

-l'échantillon est pipeté dans un puits de la CR.

-les microparticules recouvertes d'anticorps anti-ferritine, le conjugué d'anticorps anti-ferritine : phosphatase alcaline, le diluant pour échantillons et le tampon TRIS sont pipetés dans un autre puits de la CR.

La CR est immédiatement transférée dans l'unité de traitement ou le pipetage continue avec l'aiguille de traitement (**BEAMISH MR, HALES CN, ET *al*, 1972**).

➤ **Réactifs :**

Coffret-réactifs AxSYM Ferritine (7K45-20)

*Un flacon (6,9 ml) de microparticules recouvertes d'anticorps anti-Ferritine contenant des stabilisants de protéines, Conservateur : azide de sodium. (Flacon réactif 1).

*Un flacon (4,3 ml) de conjugué d'anticorps anti-ferritine : phosphatase alcaline dans du tampon TRIS contenant des stabilisants de protéines, Conservateur : azide de sodium. (Flacon réactif 2).

*Un flacon (7,5ml) de diluant pour échantillons. Tampon TRIS contenant des stabilisants de protéines. Conservateur : azide de sodium. (Flacon réactif 3).

*Un flacon (50,2ml) de tampon TRIS contenant du chlorure de sodium à 0,3 mol /l. Conservateurs azide de sodium et agents antimicrobiens. (Flacon réactif 4).

*7K45-20 comprend un coffret-réactifs AxSYM Ferritine (100 tests), des cartouches de réaction (100 pièces) et des matrices (100 pièces).

VI-6- DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINE :

- **PRINCIPE :**

-LE PRINCIPE DU DOSAGE ASSOCIE LA METHODE IMMUNOENZYMATIQUE PAR IMMUNOCAPTURE A UNE DETECTION FINALE EN FLUORESCENCE (ELFA), (FORTIER ET AL. 1990). (FIGURE12)



FIGURE 17 : APPAREIL MINI VIDAS (ELFA).

-le cône a usage unique sert a la fois de phase solide et de système de pipetage. Les autres réactifs de la réaction immunologique sont prêts à l'emploi et pré repartis dans la cartouche.

-Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument.

Elles sont constituées d'une succession de cycle d'aspiration/refoulement du milieu réactionnel.

-Dans une première étape l'échantillon est dilué, puis aspiré et refoulé à l'intérieur du cône. Les anticorps présents dans l'échantillon vont se fixer aux antigènes fixés à l'intérieur du cône.

-Des étapes de lavage éliminent le composés non fixés à la cour de la seconde étape des Ig monoclonales (souris) anti-Ig humaines conjuguées a la phosphatase alcaline sont aspirées et refoulées a l'intérieur du cône et vont se lier aux Ig humaines fixées sur l'antigène.

-Lors de l'étape finale de révélation .le substrat (4-méthyle-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-méthyle-ombelliferone) .

Dont la fluorescence émise est mesurée a 450nm .la valeur du signal de fluorescence est proportionnelle a la concentration de l'anticorps présent dans l'échantillon.

-A la fin du test, les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport a une courbe de calibration mémorisée, puis imprimés et sont interprètes (**FORTIER ET *al.* 1990**).

VI-7-Etude statistique

Pour l'analyse statistique, les données ont été saisies et analysée par le logiciel ***Statview (1997)***. La mesure de l'association entre l'anémie, les facteurs de risques et leur effet sur le système immunitaire est réalisée selon un modèle de régression logistique. Les résultats sont donnés sous forme des tableaux et d'histogrammes. Nous avons adopté un degré de signification de $p < 0,05$. L'ANOVA test n'est pas négligé.

VI-8-Partie Bactériologie.

VI-8-1-Objectif

Le but de ce travail est d'isoler les bactéries du genre *Pseudomonas* productrices de siderophores à partir des prélèvements (de crachats, de sécrétions purulentes des yeux, de frottis pour des enfants souffrants d'infections cutanéomuqueuses, d'urine pour des enfants souffrants d'infections urinaires et de frottis également sur des plaies purulentes d'enfants opérés) effectués sur des enfants souffrants d'infections diverses et hospitalisés au service de pédiatrie et de CCI au CHU de SBA durant une période s'étendant du mois d'Octobre 2014 au mois de mars 2015 et le dosage des siderophores de type pyoverdine produits par ces bactéries avant et après l'addition dans le milieu de dosage de ces derniers d'un bactériostatique : siderocalin qu'on a supposé l'existence dans le sérum de ces enfants puisque c'est un élément extracellulaire.

Critères d'inclusion

-Enfants de 2 à 12 ans et de
Tout sexe

-Survenue d'une infection

Critères d'exclusion

- culture négative de
Pseudomonas
(30 positives parmi 57 négatives)
- Responsabilité douteuse de
Pseudomonas sur la
Symptomato­logie présentée

VI -8-2-Echantillonnage

Ont été recrutés toutes les personnes hospitalisées au niveau de service de pédiatrie et de CCI du CHU de SBA et répondant aux critères pendant la période d'étude.

VI-8-3-Stratégie d'isolement

- Essai d'isolement de *Pseudomonas aeruginosa*

A partir de chaque prélèvement, un échantillon est pris dans le but de réaliser un enrichissement en bouillon nutritif (1 ml dans un tube de 9 ml), 24h à une température de 42°C visant à croître la biomasse initiale afin d'avoir plus de chance de repérer les individus bactériens recherchés. Le choix de la température (42°C) vise à favoriser les *Pseudomonas aeruginosa* qui sont censés croître à cette température contrairement à un bon nombre de micro-organismes.

A la suite de l'enrichissement, l'isolement sur gélose cétrimide (milieu favorisant la pigmentation et la fluorescence additionné d'un agent sélectif inhibant les bacilles Gram(+)) ainsi que certains Gram(-), laissant l'avantage ainsi aux *Pseudomonas Spp.* Dont certaines espèces pouvant être détectées grâce à la fluorescence sous UV (254nm, 366nm) favorisée par la présence de certains sel et entrepris à la même température (42°C) durant une incubation de 24h.

Les souches de *P.aeruginosa* sont reconnues par leur production de pigments, en plus de la morphologie des colonies et l'odeur caractéristique de l'aminocétophone, donnant une odeur fruitée associée à celle des pommes vertes, ou ressemblant à celle de seringa (jasmin des poètes) (Gaillard, 1991).(Figure 25).

➤ Essai d'isolement de *Pseudomonas fluorescents*

A partir des mêmes prélèvements, un enrichissement dans le même but et de la même manière que le précédent fut entrepris à une température de 30°C suivie d'une tentative d'isolement sur cétrimide' réalisée toujours à la même température de (30°C) favorable aux *P.fluorescens*.

➤ Purification des souches

Les colonies sont observées sous une lampe UV à 366nm, celles qui sont fluorescentes ont été sélectionnées, purifiées 2 fois par stries d'épuisement (de type hexagonal) sur gélose King B et conservées à 4°C dans un bouillon nutritif glycérolé à 20%.

VI-9-Estimation de la production de siderophores de type pyoverdine avant l'addition du sérum humain supposé contenir : siderocalin

Afin de sélectionner les candidats les plus performants en termes de production de pyoverdine, le dosage de ce métabolite a été entrepris chez les souches isolées de la manière suivante :

Cette quantification est réalisée selon le protocole établie par **Meyer et Abdellah, 1978**. Le milieu Glucose-Urée (GUM) a été utilisée pour cette expérience, répartie dans des erlens de 250ml, chacun contenant 100ml de milieu de culture inoculé par 1ml à partir de culture en tube à essai de 48h sur bouillon NB(25ml, agitation de 100 rpm/mn).Après 48h d'incubation, des prélèvements de 1.5ml sont mis dans des eppendorfs de même contenance (1.5ml) et centrifugés à 10.000 rpm pendant 30mn, le surnageant (1ml) est mis dans une cuvette de spectrophotomètre pour la lecture de la DO à une longueur d'onde $\lambda=400\text{nm}$. Le milieu de culture vierge a servi de blanc pour l'étalonnage de l'appareil. La valeur ainsi lue permet la détermination du taux de pigment produit en utilisant le coefficient d'extinction molaire estimé par **Meyer et Abdellah** à une longueur d'onde de 400nm, $\epsilon=20.000$ (**Figure 26**)

VII-9-1-Identification des isolats retenus

VII-9-2-Identification phénotypique des isolats

A l'issue du dosage, 3 candidats sont sélectionnés comme étant ceux ayant donné les taux de production les performants au sein du groupe testé pour être identifier.

Les bactéries ainsi retenues font l'objet d'une identification phénotypique basée sur les caractères suivants :

- **Aspect des colonies bactériennes sur divers milieux de culture (King B, Cétrimide)**
(Examen macroscopique)

Après ensemencement sur différentes géloses (King B et cétrimide), on s'intéresse à l'aspect macroscopique des cultures vues à l'œil nu (couleur, taille des colonies, opacité, diffusion de pigment et importance de la croissance) et sous une lampe binoculaire (aspect des colonies bactériennes) : Les *Pseudomonas* fluorescentes donnent des colonies de petites tailles avec des pigments fluorescents (bleu-vert pour *Pseudomonas aeruginosa*, vert pour *Pseudomonas fluorescens*) et possèdent une odeur caractéristique (de Seringa pour les premières, celles de pourriture pour les deuxièmes).

➤ **Observation microscopique à l'état frais**

Elle permet de noter la forme, la mobilité et le mode d'agencement des cellules bactériennes.

A partir de la suspension bactérienne, on prélève une goutte avec une anse de platine stérile, on étale sur une lame et on recouvre avec une lamelle tout en évitant la formation des bulles d'air. On observe ensuite par le microscope optique au grossissement $\times 100$ après l'ajout d'huile d'immersion.

➤ **Observation microscopique après fixation (coloration de Gram)**

C'est la coloration de base en Bactériologie, elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des caractères essentiels de la systématique des bactéries.

Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- la différence de composition chimique des bactéries
- la différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool.

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consistent à :

- ✓ Fixer le frottis
- ✓ Recouvrir le frottis de cristal de violet (violet de gentiane), laisser agir une minute.
- ✓ Rejeter le colorant puis laver à l'eau.
- ✓ Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute.
- ✓ Rejeter le lugol puis laver à l'eau.
- ✓ Décolorer à l'alcool 95°.
- ✓ Rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de fushine diluée, laissé agir quelques secondes.
- ✓ Rejeter la fushine, lavé abondamment, égoutté, sécher entre deux feuilles de papier buvard propre.

A l'issue de la coloration de Gram, les cellules prenant une coloration rose sont dites bactéries Gram(-), celles ayant pris une coloration violette sont dites Gram(+). Toutes fois, il existe des individus ne prenant aucune coloration : ce sont les BAAR (Bacilles Acido-Alcolo Résistants, tel que *Mycobacterium tuberculosis*) (Harley et Prescott, 2002).

➤ Type respiratoire

Le principe est basé sur la croissance des bactéries selon la présence ou l'absence d'oxygène : les germes nécessitant la présence d'O₂ sont dits germes **aérobies strictes**, ceux qui n'arrivent pas à croître en présence d'O₂ sont dits germes **anaérobies strictes**, ceux qui poussent indifféremment de la présence d'oxygène ou non sont dits germes **aérobies anaérobies facultatifs**, et enfin une nécessité de faible pression partielle en oxygène caractérise les germes **micro-aérophiles**.

La détermination du type respiratoire a été réalisée sur gélose Viande Foie(VF), qui une fois régénérée, elle estensemencée dans la masse, et mélangée ainsi. Après incubation, les bactéries poussant seulement sur la surface sont décrites comme étant aérobies strictes. Une croissance dans la masse, au fond du tube inoculé caractérise les bactéries anaérobies strictes.

Une croissance dans les deux zones décrites en haut détermine les bactéries aero-anaérobies facultatives. Dans le cas d'une croissance sous la surface de la gélose, les germes sont de type micro-aérophiles.

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires (principalement *Pseudomonas*) ne se développent qu'au niveau de la surface, c'est-à-dire en présence d'oxygène. Ce sont des aérobies stricts (**Harley et Prescott, 2002**).

➤ Test de catalase

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène et constitue un bon élément de différenciation utilisé en systématique bactérienne. La technique consiste à réaliser un frottis à partir des colonies prélevées sur gélose King B, sur lequel on dépose quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène. La présence de catalase se matérialise par une production de bulles instantanément (**Harley et Prescott, 2002**).

VII-9-3-Procédure d'identification biochimique par système API (20NE).

La galerie API 20 NE (bioMerriex) est un système standardisé utilisé pour l'identification des bacilles à Gram(-) non exigeants et non entériques (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.). C'est une méthode rapide d'identification fréquemment utilisée, basée sur la dégradation des substrats biochimiques contenus dans les micros tubes. La galerie API 20 NE se compose de 20 micros tubes contenant des milieux et des substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant (**Delahaye, 2005**).

L'inoculation des galeries est faite selon les directives du fabricant : Des colonies bactériennes de la souche qui a donné un taux de production important parmi les souches testées a été dilué dans une solution de Na Cl 0.9%. L'inoculum a été standardisé à une concentration cellulaire de 10^6 à 10^8 UFC/ml, équivalente à un standard MC Ferland 0.5, ceci en utilisant la DO_{600} , ajustée entre 0.09 et 0.1.

Certains tests sont inoculés seulement au niveau des tubes, d'autres par contre nécessitent l'inoculation de toute la cupule en plus du tube, d'autre font intervenir l'utilisation d'une solution saline à laquelle on ajoutera un inoculum initial avant d'inoculer les tubes et afin d'éviter tout contact avec l'air, certaines cupules ont été remplies avec de l'huile de paraffine, ce après quoi, les galeries ont été incubées pendant 24 à 48h à une température de $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$ dans une enceinte humide (par les supports de galeries dont les alvéoles ont été remplies d'eau distillée stérile).

La lecture des résultats s'est faite en se rapportant au guide d'utilisation, soit directement en notant le changement de l'aspect de la cupule (couleur, turbidité) ou indirectement en utilisant à juste titre les réactifs de révélation (VP, NIT1 et NIT2, JAMES...). Les résultats de chaque galerie sont reportées sur les fiches d'identification ou une simple blanche sous forme de signes (+) pour les tests positifs et (-) pour les tests négatifs.

L'interprétation des résultats a été effectuée par ordinateur basée sur une approche heuristique en utilisant le programme PIBwin version 2.0.0, avec des matrices d'identification pour les systèmes API 20 et 20NE élaborées à partir des guides d'utilisation des deux systèmes, fournis par la société BioMerriex, France (voir l'annexe «Procédure d'utilisation des systèmes API 20 et 20NE»).

VII-9-4--Estimation de la production de siderophores de type pyoverdine après l'addition du sérum humain supposé contenir : siderocalin

Cette quantification est réalisée toujours selon le protocole établie par **Meyer et Abdellah, 1978**. Le milieu Glucose-Urée (GUM) a été utilisée pour cette expérience, répartie dans des erlens de 250ml, chacun contenant 100ml de milieu de culture inoculé par 1ml à partir de culture en tube à essai, on ajoute 0.5ml de sérum humain à la préparation (250ml, agitation de 100 rpm/mn).Après 48h d'incubation, des prélèvements de 1.5ml sont mis dans des eppendorfs de même contenance (1.5ml) et centrifugés à 10.000 rpm pendant 30mn, le surnageant (1ml) est mis dans une cuvette de spectrophotomètre pour la lecture de la DO à une longueur d'onde $\lambda=400\text{nm}$. Le milieu de culture vierge a servi de blanc pour l'étalonnage de l'appareil. La valeur ainsi lue permet la détermination du taux de pigment produit en utilisant le coefficient d'extinction molaire estimé par **Meyer et Abdellah** à une longueur d'onde de 400nm, $\epsilon=20.000$.

Schémas récapitulatifs des protocoles expérimentaux

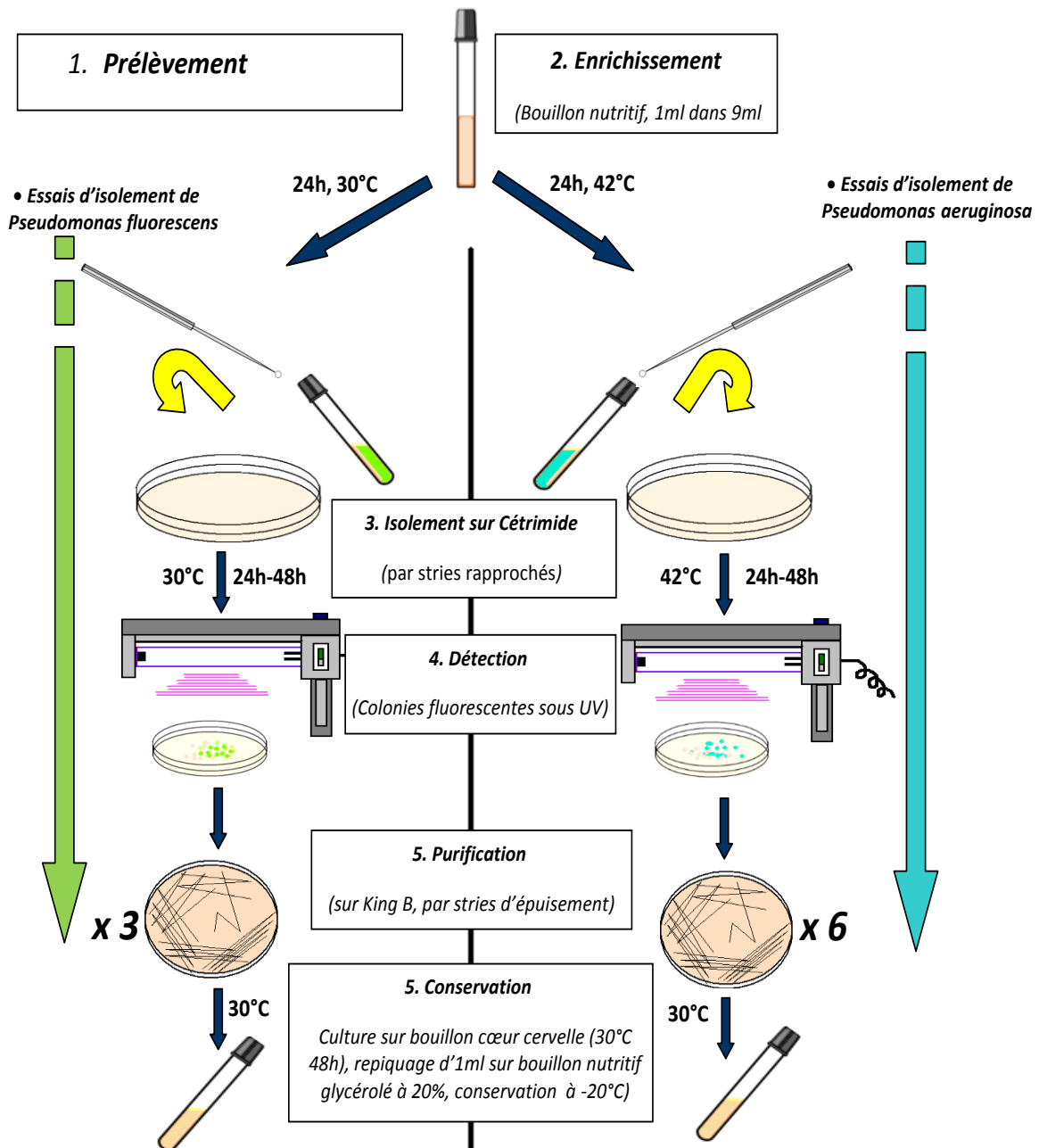
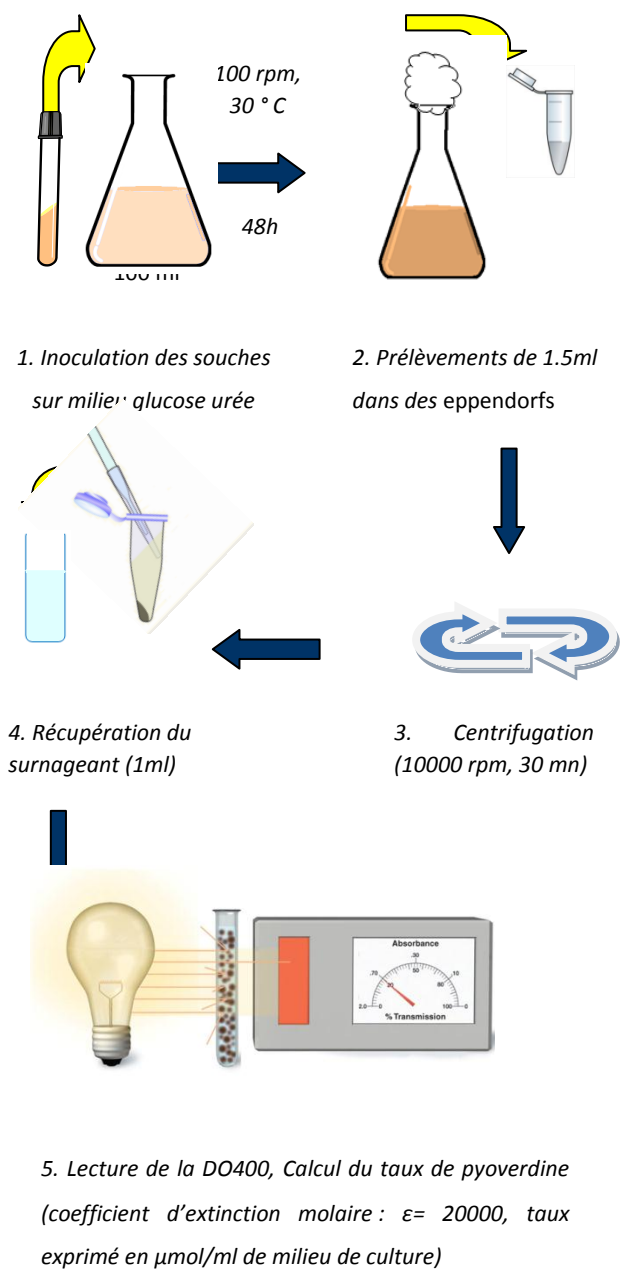


Figure 25 : Stratégie d'isolement et de purification des souches de *Pseudomonas* fluorescentes (*Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa*)



Dosage de la pyoverdine

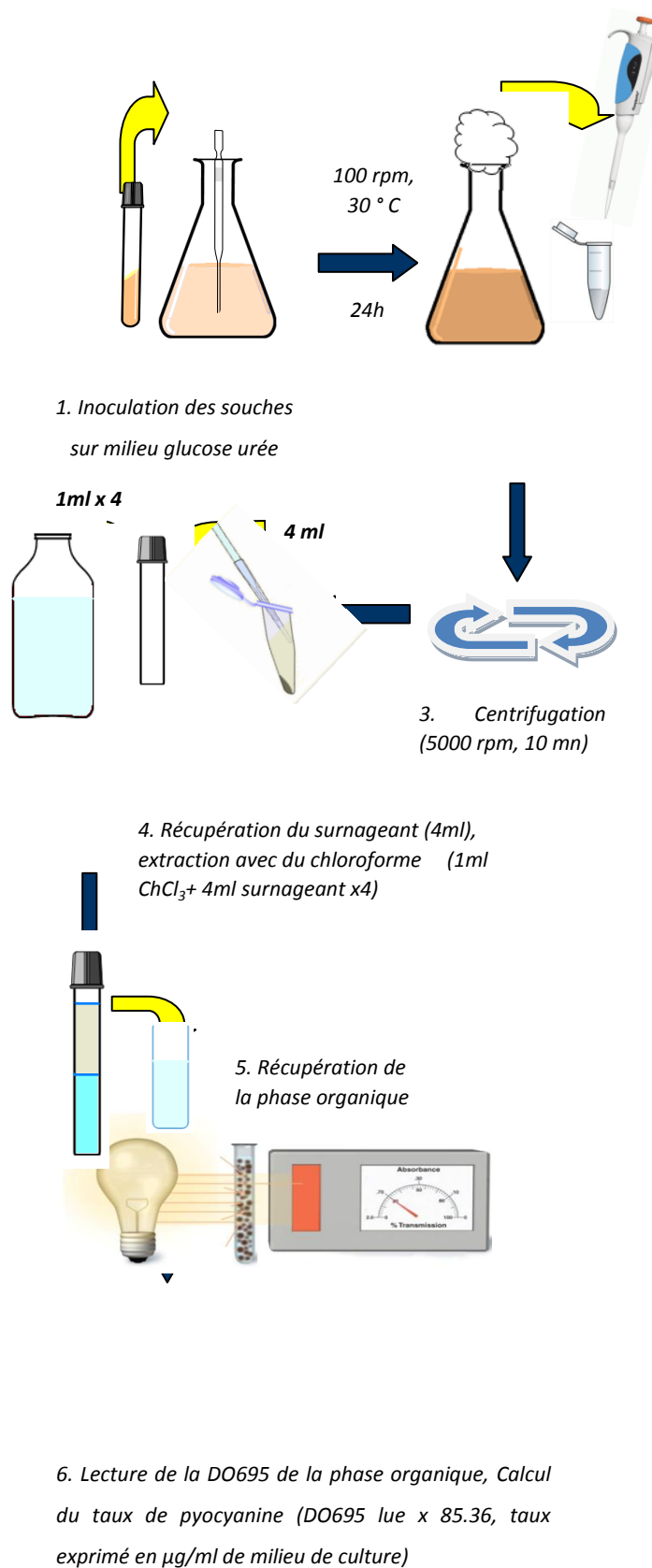


Figure 26 : Schéma récapitulatif du dosage des siderophores.

PARTIE 2

RÉSULTATS ET DISCUSSION

VI-10-Résultats des enquêtes épidémiologiques.

Notre première étude a été portée sur un échantillon constitué de 200 enfants, dont 101 sont anémiques (**groupe d'étude**) et le reste 99 sont non anémiques (**groupe témoins**). L'âge moyen des patients anémiques est de 23.3 mois $\pm$ 16.6, alors que celui de groupe témoin est de 24.09 mois $\pm$ 16.6, ($p=0.75$).

En ce qui concerne les caractéristiques anthropométriques (âge et le sexe), aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux groupes (anémique et témoin), ($p>0.05$).

La gravité de l'anémie a été classée en trois stades suivants :

- L'anémie sévère définit par un taux de $Hb < 7 \text{ g/dl}$
- L'anémie modérée définit par un taux de $7 < Hb < 10 \text{ g/dl}$
- L'anémie légère correspond à un taux de $10 < Hb < 11 \text{ g/dl}$

En ce qui concerne notre échantillon ($n=101$), on a remarqué que 21.78% souffrent d'une anémie sévère, 63.36 % des enfants ont une anémie modérée, alors que le reste soit 14.85 % représente une anémie légère (**Figure 18**).

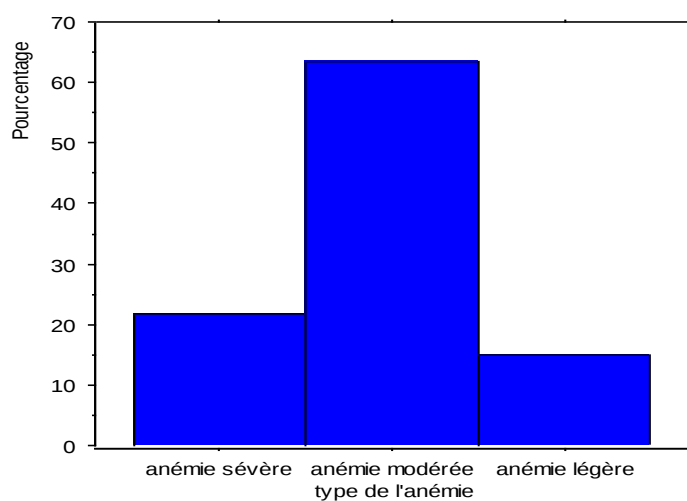


Figure 18 : Répartition des enfants anémique ($n=101$) en fonction de degrés de l'anémie.

❖ RESULTATS DE BILAN HEMATOLOGIQUE

En ce qui concerne le bilan hématologique. **LE TABLEAU 11** présente les paramètres hématologiques mesurés chez les enfants anémiques (**groupe d'étude**) comparés aux enfants non anémiques (**groupe témoin**). Nous avons noté une différence statistique significatif dans les deux groupes (**d'étude et témoin**), ($p < 0.05$)

TABLEAU 11: – Paramètres d'évaluation du statut en fer (moyenne $\pm$ SD, Effectifs.) De l'ensemble de l'échantillon et comparaison entre le groupe d'étude (Enfants anémiques) et le groupe témoins (enfants non anémiques)

Groupe d'étude (n=101)		Groupe témoin (n=99)	P
<i>Moyenne $\pm$ Dév. Std</i>		<i>Moyenne $\pm$ Dév. Std</i>	
Hémoglobine (g/dl)	08,409 $\pm$ 1,544	13,279 $\pm$ 1,178	<0,0001 S
Hématocrite (%)	27,617 $\pm$ 5,800	41,074 $\pm$ 4,217	<0,0001 S
VGM (fl)	72,973 $\pm$ 12,451	87,527 $\pm$ 8,783	<0,0001 S
TCMH (pg)	24,725 $\pm$ 4,827	30,050 $\pm$ 3,594	<0,0001 S
CCMH (%)	30,583 $\pm$ 2,873	33,376 $\pm$ 2,298	<0,0001 S
FERRITINE (μ g/l)	28,783 $\pm$ 25,076	106,602 $\pm$ 47,520	<0,0001 S
FER SERIQUE (μ g/100ml)	45,670 $\pm$ 25,495	129,828 $\pm$ 31,206	<0,0001 S

Nos résultats montrent que les taux d'Hb, l'Ht, VGM, TCMH et CCMH présentent une différence significativement hautement diminuée chez les enfants anémiques comparés aux enfants témoins ($p < 0.0001$). (**Figure 19**).

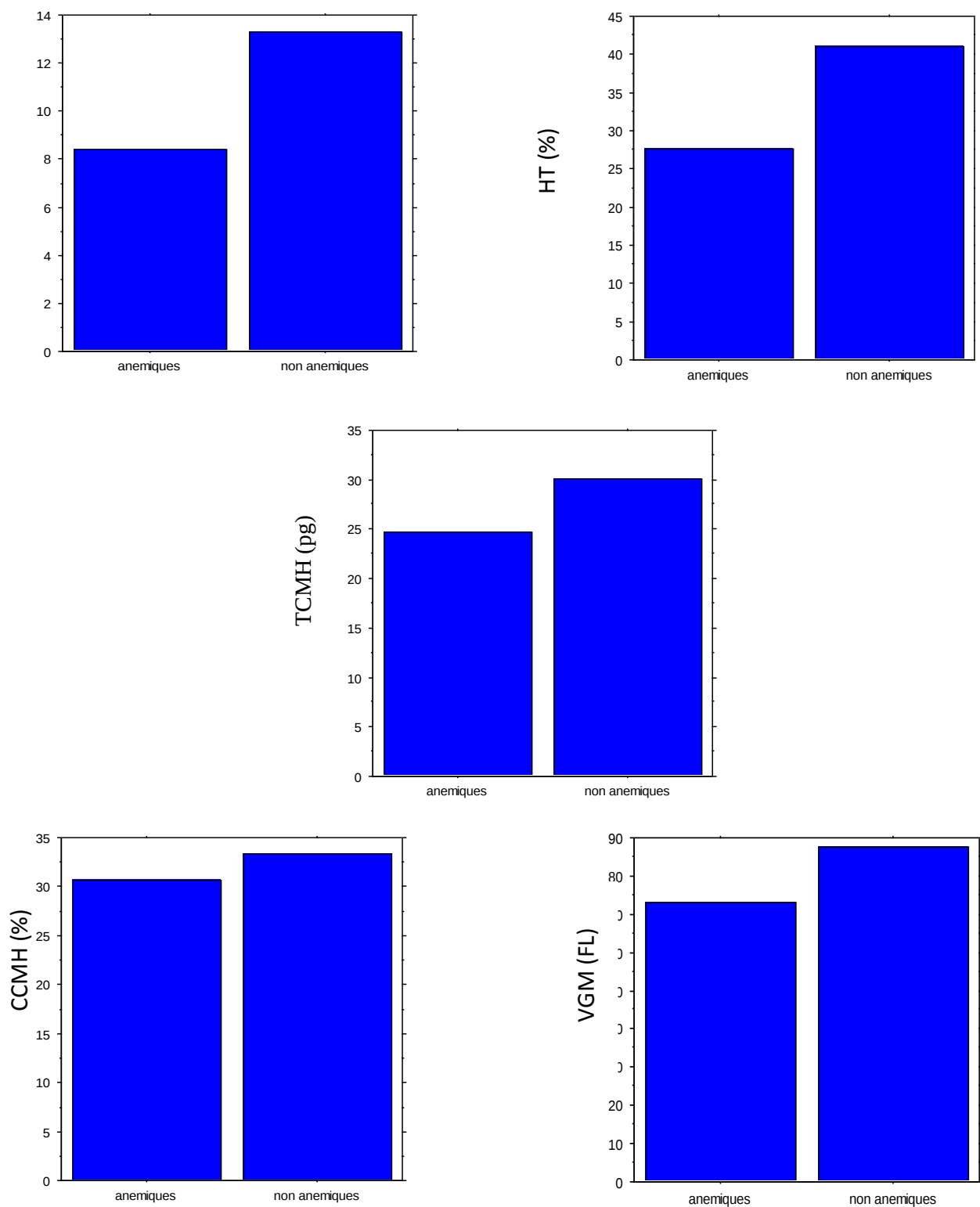


FIGURE 19 : Paramètres hématologiques déterminés chez le groupe d'étude (anémiques) et le groupe témoins (non anémiques).

Pour le bilan biochimique. Les paramètres déterminés dans notre étude sont le fer sérique et la ferritine.

Les paramètres biochimiques mesurés chez notre population d'étude sont rapportés dans la (**FIGURE 20**). Nos résultats montrent que les taux du fer sérique et la ferritine présentent une différence significativement hautement diminuée chez les enfants anémiques ($p < 0.0001$).

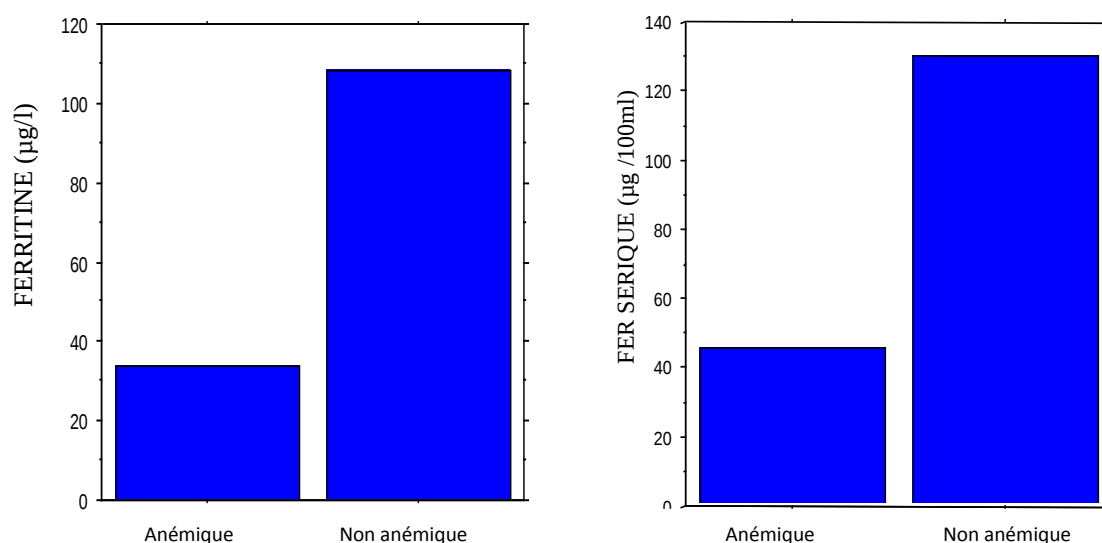


Figure 20: Paramètres biochimiques déterminés chez le groupe d'étude (anémiques) et le groupe témoins (non anémiques).

Par contre, lorsque nous nous sommes intéressés aux cellules immunitaire (**TABLEAU 12**). Nous avons révélé que le taux de Neutrophile présente une différence significatif hautement élevée entre les deux groupes (*étude et témoin*), ($p < 0.0001$), et une différence significatif légère pour le taux des monocytes ($p < 0.044$) et des lymphocytes ($p < 0.026$). (**Figure 21**).

TABLEAU 12 : Résultat de l'immunité cellulaire (%).

	Groupe d'étude (n=101)	Groupe témoin (n=99)	P
	Moyenne ±Dév. Std	Moyenne ± Dév. Std	
NEUTROPHILE (%)	45,045±15,982	57,562±16,267	<0,0001 S
LYMPHOCYTE (%)	43,681±17,936	38,199±16,699	<0,026 S
MONOCYTE (%)	5,529±3,720	4,574±2,910	<0,044 S
EOSINOPHILE (%)	0,881±1,385	0,877±0,938	0,979 NS
BASOPHILE (%)	0,307±0,522	0,387±0,603	0,318 NS

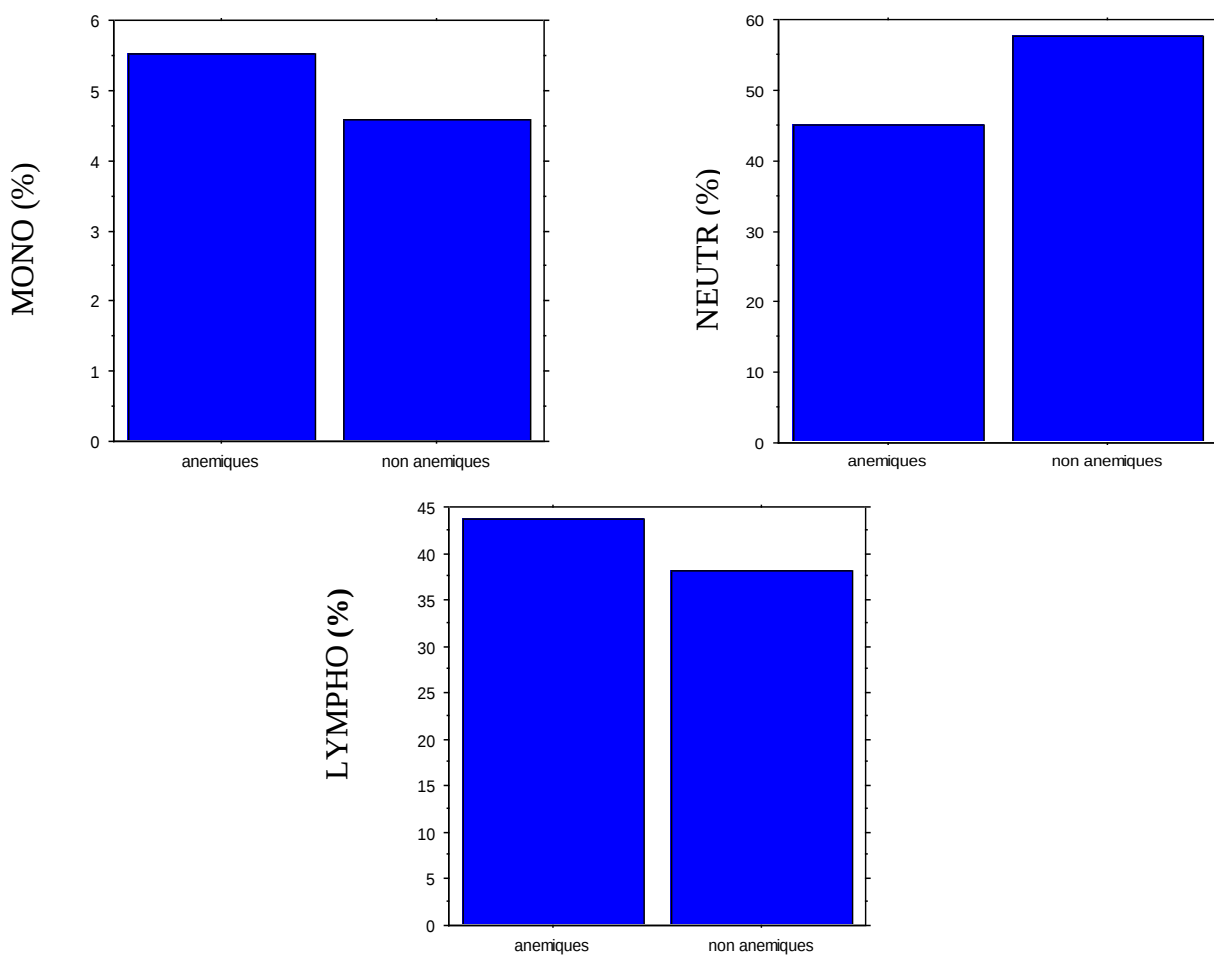


FIGURE 21 : Paramètres immunologiques déterminés chez le groupe d'étude (anémiques) et le groupe témoins (non anémiques) entre les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes.

Pour les taux des basophiles, éosinophiles, aucune différence significatif n'a été trouvée entre les deux groupe ($p > 0.05$).

Un autre volet a été soulevé dans la présente étude. C'est le dosage des immunoglobulines et de chercher la probable corrélation avec les paramètres du statut en fer.

Nos résultats révèlent que le taux des IgG, IgD, IgA présente une différence significatif hautement élevée entre les deux groupes (*étude et témoin*), respectivement ($p < 0.0001$, $p < 0.008$, $p < 0.0049$), (**FIGURE 22**). Par contre les taux des IgE ne présente aucune différence significatif ($p > 0.05$), (**TABLEAU 13**).

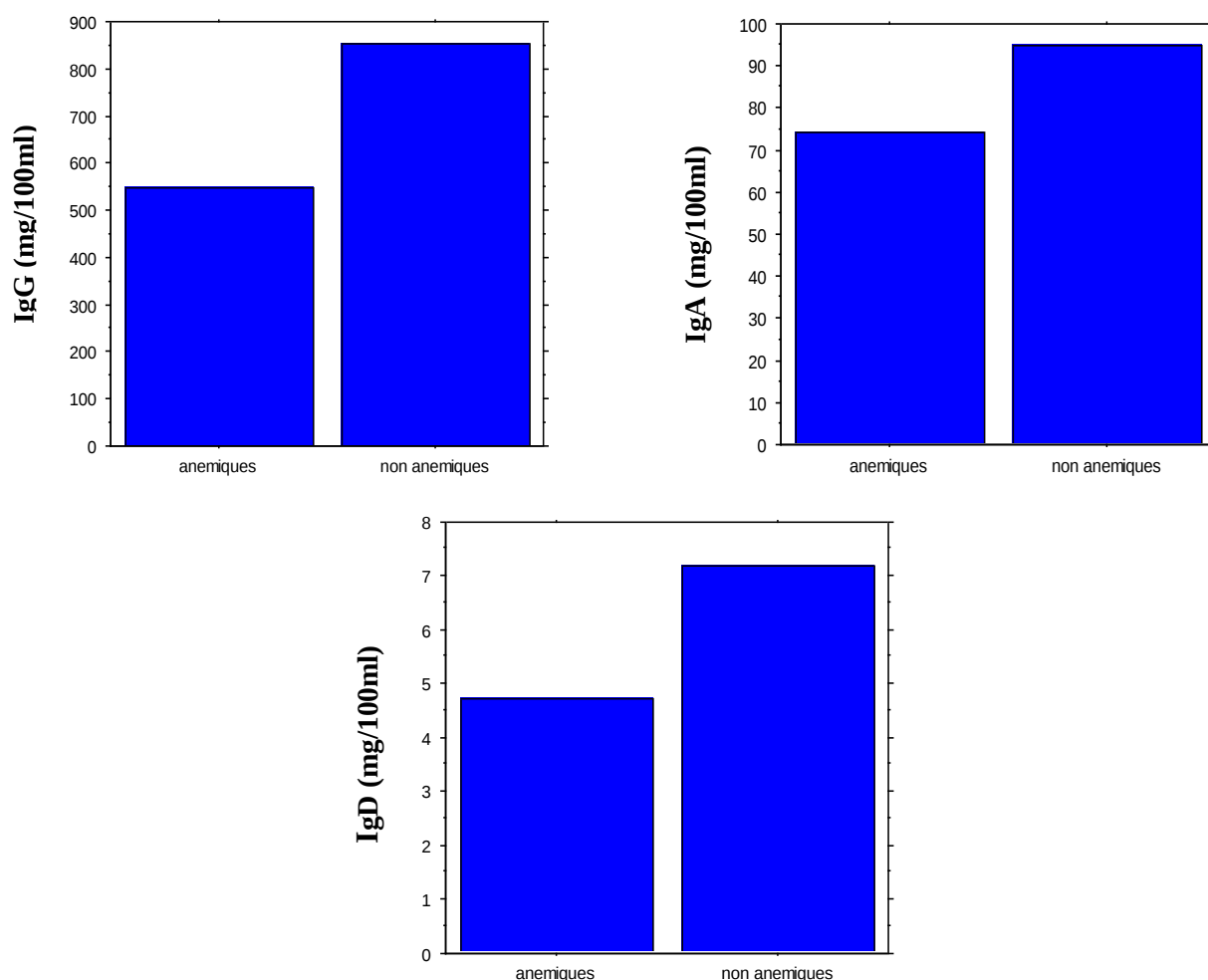


Figure 22 : Paramètres immunologiques déterminés chez le groupe d'étude (anémiques) et le groupe témoins (non anémiques).

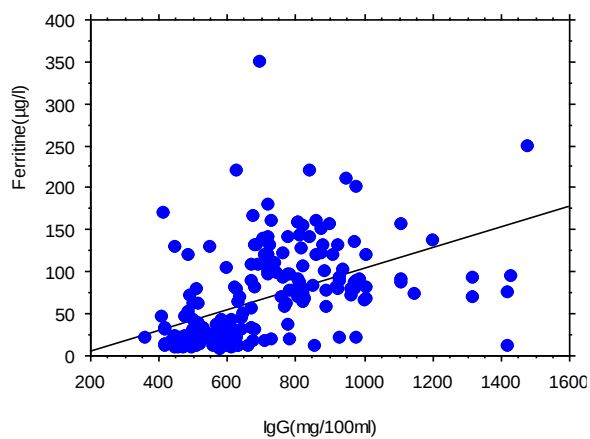
TABLEAU13 : Résultats de L'Immunité humorale (mg/100ml).

	<i>Groupe d'étude (n=101)</i>	<i>Groupe témoin (n=99)</i>	<i>P</i>
	<i>Moyenne ± Dév. Std</i>	<i>Moyenne± Dév. Std</i>	
IgG (mg/100ml)	548,772±91,885	852,714±181,424	<0,0001 S
IgE (mg/100ml)	0,223±0,270	0,294±0,314	0,0874 NS
IgA (mg/100ml)	74,123±35,109	94,936±64,452	<0,0049 S
IgD (mg/100ml)	4,729 ±6,53	7,191±6,439	<0,0081 S
IgM (mg/100ml)	73,343±31,013	76,911±32,700	0,429 NS

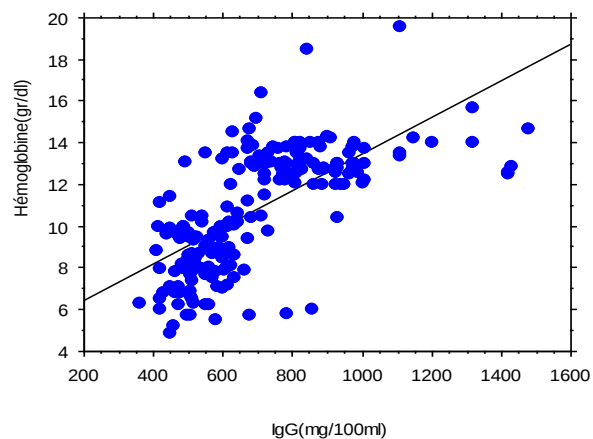
Une forte corrélation a été noté dans notre étude, entre certains paramètres du statut en fer (fer sérique, Ferritine, Hb, VGM, TCMH, CCMH, Ht) et les IgG respectivement (r= 0.63, r= 0.48, r= 0.67, r=0.43, r=0.44, r=0.30, r=0,62), (**FIGURE 23**).

Une corrélation franche a été marqué entre le taux de l'Hb et l'Ht (r =0.88), entre Hb et le fer sérique (r= 0.85), entre Hb et le VGM (r=0.62), entre Hb et le TCMH (r=0.62), entre Hb et CCMH (r=0.57), entre Hb et ferritine (r=0.74).

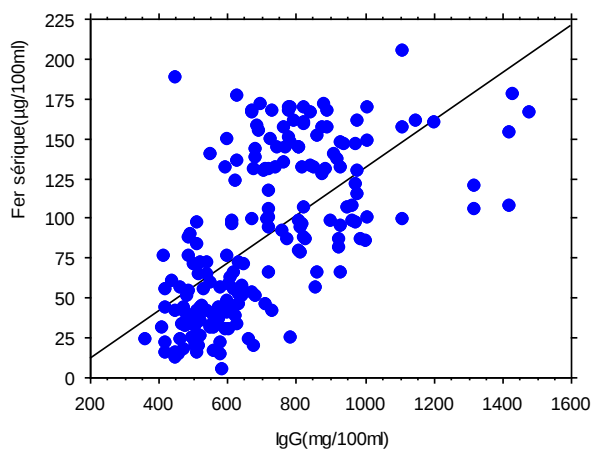
Aussi une corrélation franche a été détecté entre IgD et IgG (r=0,22), entre IgA et IgG (r=0,26).



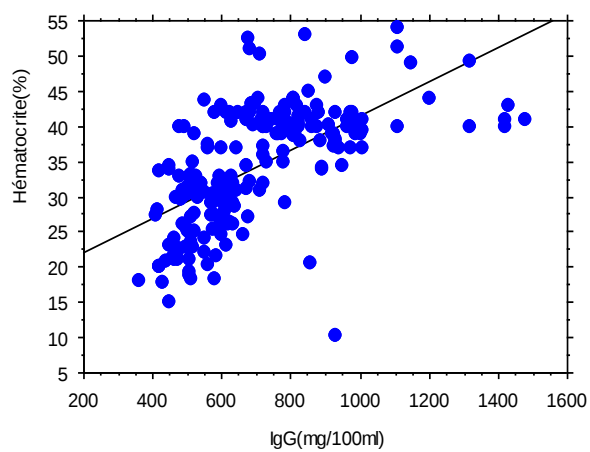
A



B



C



D

A ➤ une corrélation entre les IgG et la ferritine.

B ➤ une corrélation entre les IgG et les Hb.

C ➤ une corrélation entre les IgG et le fer sérique.

D ➤ Une corrélation entre les IgG et l'hématocrite.

FIGURE 23 : La corrélation entre les IgG et la Ferritine, Hb, Fer sérique, Ht.

Notre deuxième étude a été portée sur un échantillon constitué de 627 enfants, dont 401 sont anémiques (**groupe d'étude**) et le reste 226 sont non anémiques (**groupe témoins**).

En ce qui concerne les caractéristiques anthropométriques (âge et le sexe), aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux groupes (anémique et témoin), ($p > 0.05$).

La gravité de l'anémie a été classée en trois stades suivants :

- L'anémie sévère définit par un taux de $Hb < 7 \text{ g/dl}$
- L'anémie modérée définit par un taux de $7 < Hb < 10 \text{ g/dl}$
- L'anémie légère correspond à un taux de $10 < Hb < 11 \text{ g/dl}$
-

❖ **RESULTATS DU BILAN HEMATOLOGIQUE**

En ce qui concerne le bilan hématologique, **LE TABLEAU 14** présente les paramètres hématologiques mesurés chez les enfants anémiques (**groupe d'étude**) comparés aux enfants non anémiques (**groupe témoin**). Nous avons noté une différence statistique significative dans les deux groupes (**d'étude et témoin**), ($p < 0.05$)

Nos résultats montrent que les taux d'Hb, l'Ht, VGM, TCMH et CCMH présentent une différence significativement hautement diminuée chez les enfants anémiques comparés aux enfants témoins ($p < 0.0001$)

TABLEAU 14: – Paramètres d'évaluation du statut en fer (moyenne $\pm$ SD, Effectifs.) De l'ensemble de l'échantillon et comparaison entre le groupe d'étude (Enfants anémiques) et le groupe témoins (enfants non anémiques)

<i>Groupe d'étude (n=401)</i>		<i>Groupe témoin (n=226)</i>	<i>P</i>
<i>Moyenne $\pm$ Dév. Std</i>		<i>Moyenne $\pm$ Dév. Std</i>	
Hémoglobine (g/dl)	08,40$\pm$1,544	13,27$\pm$1,178	<0,0001 S
Hématocrite (%)	31,92$\pm$53,24	39,34$\pm$3,225	<0,0001 S
GB	11.42$\pm$1.05	07.73$\pm$0.85	<0,0001 S
GR	04.08$\pm$0.31	04.76$\pm$0.86	<0,0001 S
VGM (fl)	72,97$\pm$12,45	90.12$\pm$7.32	<0,0001 S
TCMH (pg)	24.35$\pm$1.66	29.46$\pm$1.77	<0,0001 S
CCMH (%)	27.88$\pm$2.21	33.55$\pm$1.87	<0,0001 S
FERRITINE (μg/l)	10.64$\pm$5.62	30.26$\pm$15.02	<0,0001 S
FER SÉRIQUE (μg/100ml)	49.68$\pm$68	111.16$\pm$22.19	<0,0001 S

Pour le bilan biochimique. Les paramètres déterminés dans notre étude sont le fer sérique et la Ferritine.

Nos résultats montrent que les taux du fer sérique et la ferritine présentent une différence significativement hautement diminuée chez les enfants anémiques ($p < 0.0001$). Par contre,

Par contre, lorsque nous nous sommes intéressés aux cellules immunitaire (**TABLEAU 15**). Nous avons révélé que le taux de Neutrophile et de lymphocytes présente une différence significatif hautement élevée entre les deux groupes (**étude et témoin**), ($p < 0.0001$).

TABLEAU 15 : Résultat de l'immunité cellulaire (%).

	Groupe d'étude (n=401)	Groupe témoin (n=226)	P
	Moyenne ±Dév. Std	Moyenne ± Dév. Std	
NEUTROPHILE (%)	71.09±5.02	58.74±8.40	<0,0001 S
LYMPHOCYTE (%)	41.38±3.52	33.06±4.98	<0,0001 S

Un autre volet a été soulevé dans la présente étude. C'est le dosage des immunoglobulines et de chercher la probable corrélation avec les paramètres du statut en fer.

Nos résultats révèlent que le taux des IgG, IgM, IgA présente une différence significatif hautement élevée entre les deux groupes (*étude et témoin*), respectivement (p<0.0001).

TABLEAU 16 : Résultats de L'Immunité humoral (mg/100ml).

	Groupe d'étude (n=401)	Groupe témoin (n=226)	P
	Moyenne ± Dév. Std	Moyenne± Dév. Std	
IgG (mg/100ml)	1493.14±53.35	1080.21±216.48	<0,0001 S
IgA (mg/100ml)	461.71±19.09	278.87±90.63	<0,0001 S
IgM (mg/100ml)	194.57±33.38	141.23±38.52	<0,0001 S

❖ Résultats de l'enquête épidémiologique sur les bactéries responsables d'infection :

L'analyse de nos échantillons a mis en évidence la présence de plusieurs bactéries responsables d'infection diverses figurant dans l'histogramme suivant:

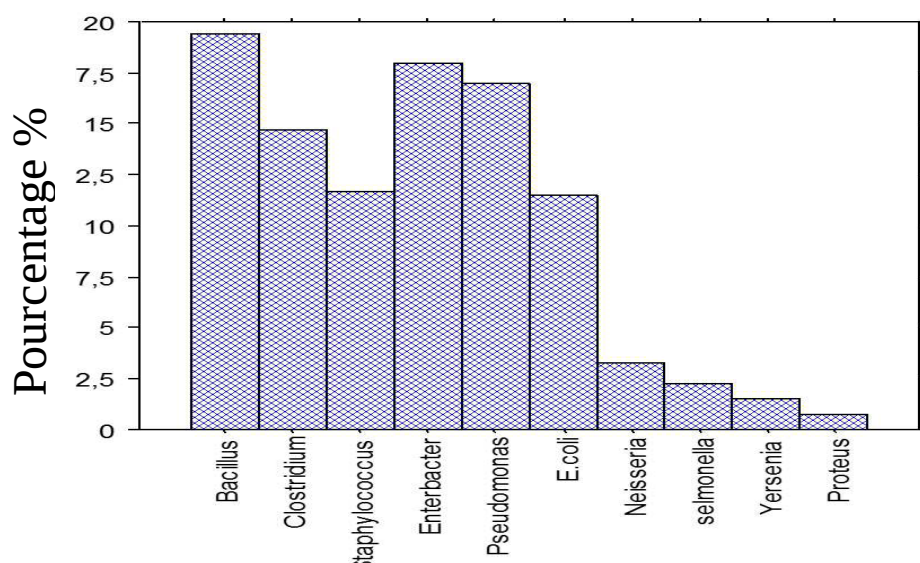


Figure 24 : types de bactéries responsables d'infection chez notre population d'étude.

Nous nous sommes intéressés au genre *Pseudomonas* en termes de sa capacité à produire les siderophores de type pyoverdine.

VI-10-1-Résultats de la partie Bactériologique

Notre étude a été portée sur un échantillon constitué de 87 enfants présentant des infections diverses et notamment respiratoires mettant en cause le germe étudié. Nous avons constaté la présence de *Pseudomonas* à travers les cultures ; constatation basée sur des caractères phénotypiques (colonies caractéristiques, odeur, fluorescence sous UV).

VI-10-2-Essai d'isolement des *Pseudomonas fluorescentes*

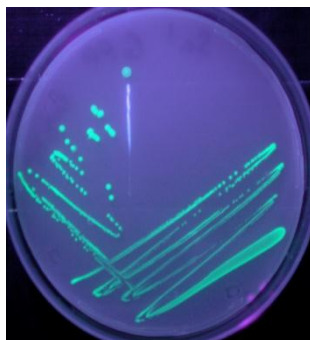
La mise en culture des prélèvements biologiques effectués sur les enfants hospitalisés et répondants aux critères cités dans le chapitre matériel et méthode, aboutit à l'isolement de 30 souches bactériennes sélectionnées sur la base de leur capacité à fluorescer (fluorescence verte- jaunâtre sous une lampe UV à 366 nm). (**Tableau 17**).

Les souches isolées et purifiées sur milieu King B et cétrimide (qui est un milieu sélectif favorisant la pigmentation et la fluorescence des bactéries), une coloration de Gram a été effectuée pour les isolats retenus pour confirmer leurs puretés et leur espèce de Gram, tous les isolats obtenus sont des bactéries à Gram négatif.



Aspect de *P.aeruginosa*

Sur gélose Cétrimide



Aspect de *P.fluorescens*

Sur gélose Cétrimide



Des colonies observées

sous une lampe UV

L'observation de la fluorescence sur le milieu de culture Cétrimide qui favorise la production de pigments fluorescents a permis de mettre en évidence la synthèse de tels pigments, trait considéré comme utile dans l'identification des germes supposés appartenir au genre *Pseudomonas*. L'observation de ce phénomène sous une longueur d'onde ultraviolette a été entreprise pour mettre en évidence la vraie fluorescence, due à la production de siderophores (**Figures 27,28, 29**). Les souches observées arborent une fluorescence, qui toute fois, reste faible pour être clairement interprétée. Ce qui est certain, c'est que cette capacité à

fluorescer sous UV demeure plus facile à percevoir sur gélose Cétrimide.

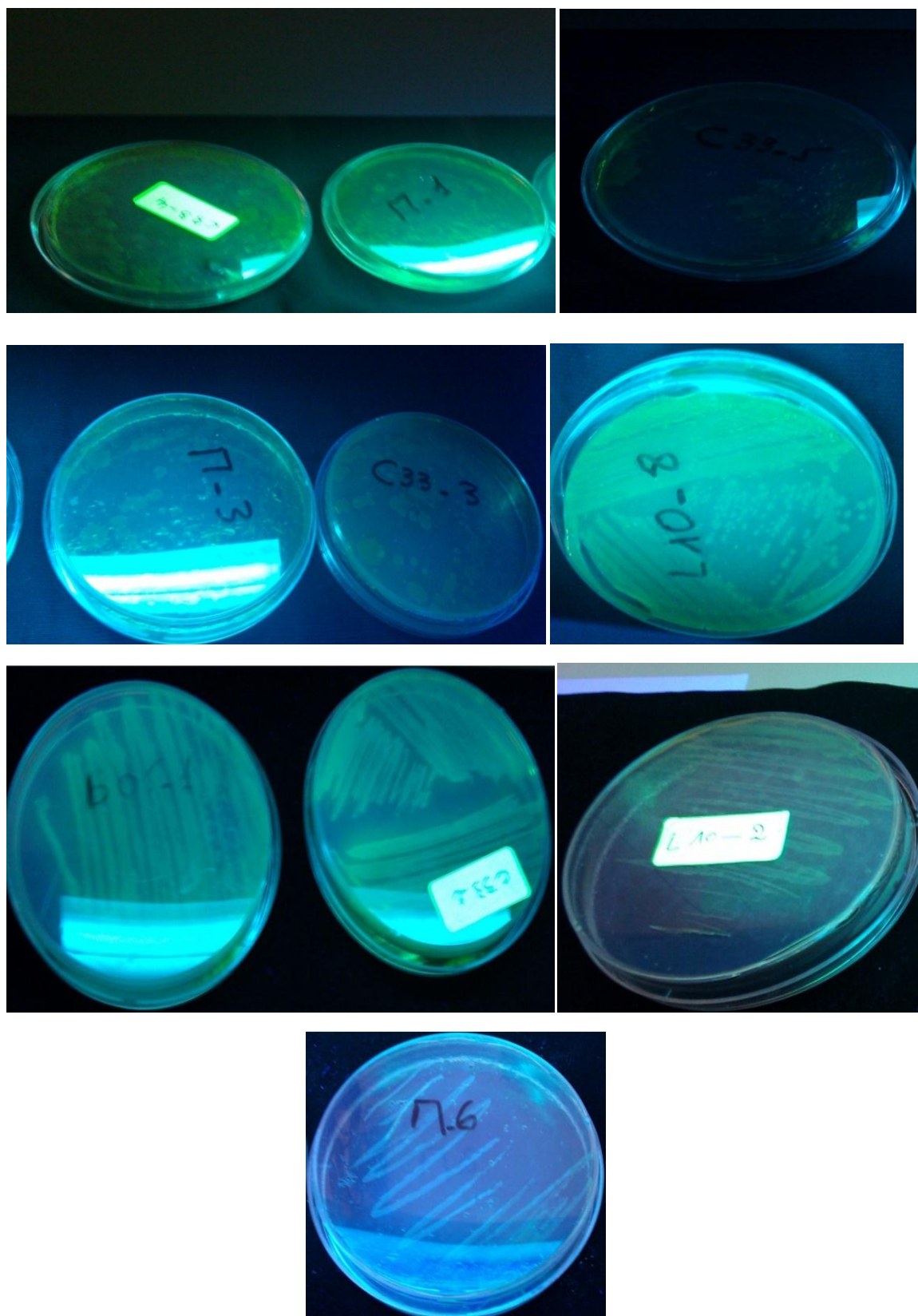


Figure 27 : Aspect des colonies des dix premières souches sur gélose cétrimide sous une lampe UV.

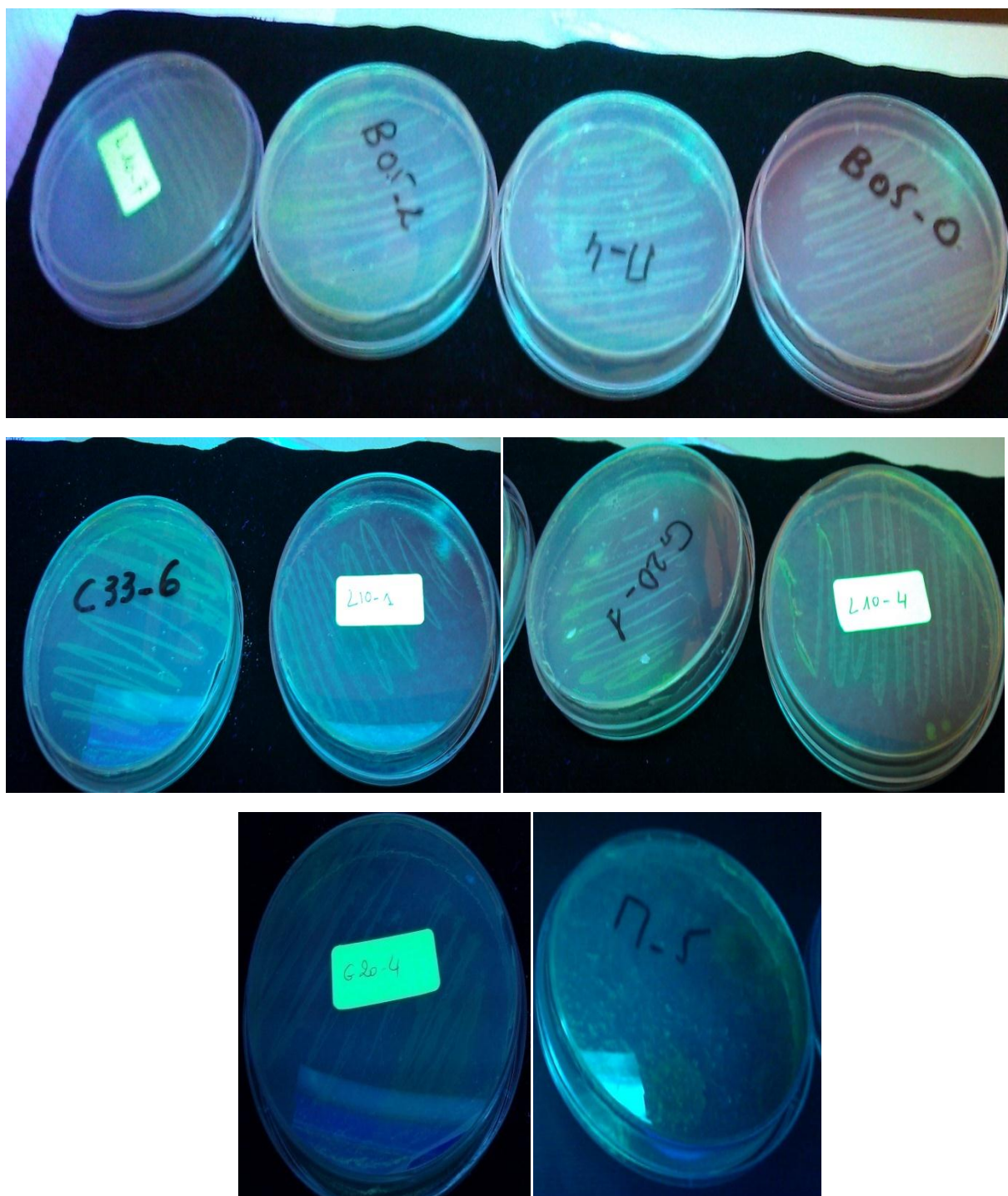


Figure 28 : Aspect des colonies des dix deuxième séries de souches sur gélose cétrimide sous une lampe UV.

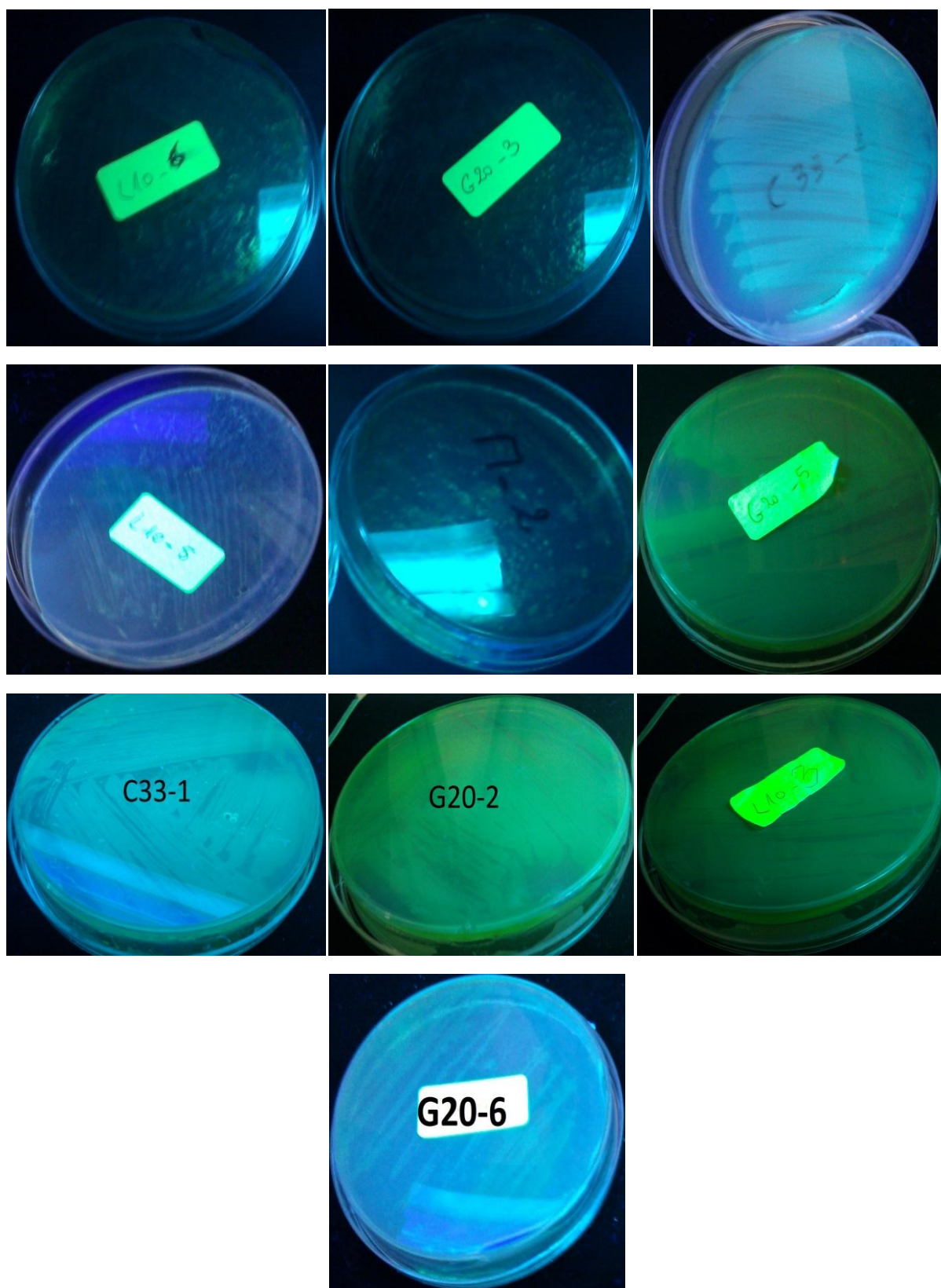


Figure 29 : Aspect des colonies des dix dernières séries de souches sur gélose cétrimide sous une lampe UV.

Tableau 17 : Codification des souches isolées, site d'isolement et type d'infection.

Codification	Site d'isolement	Type d'infection	Caractéristique de la souche sur milieu Cétrimide
B0S-0	Secrétions purulentes des yeux	Irritation oculaire	Colonies crémeuses vertes
B0S-1	Secrétions purulentes des yeux	Abcès lacrymal de l'œil	Colonies crémeuses vertes
B0S-2	Secrétions purulentes des yeux	Fistule lacrymale de l'œil	Colonies crémeuses vert
C33-1	Peau	Prurigo	Colonies crémeuses bombées et de couleur blanches cassées.
C33-2	Peau	Erythrodermie	Colonies crémeuses bombées et de couleur blanches cassées
C33-3	Peau	Prurit purulent des fèces	Colonies crémeuses bombées et de couleur blanches cassées
C33-4	Peau	Prurit des fèces	Colonies crémeuses bombées et de couleur blanches cassées
C33-5	Peau	Prurit purulent des fèces	Colonies crémeuses bombées et de couleur blanches cassées
C33-6	Peau	Erythème multiforme	Colonies crémeuses bombées et de couleur blanches cassées
M30-1	Plaie purulente (infection du site opératoire).	L'appendice	Colonies crémeuses bombées et de couleurs vertes.
M30-2	Plaie ouverte (infection du site	Hernie inguinale	Colonies crémeuses bombées et de couleurs vertes.

	opératoire).		
M30-3	Plaie purulente (infection du site opératoire).	Occlusion intestinale	Colonies crémeuses bombées et de couleurs vertes.
M30-4	Plaie purulente (infection du site opératoire).	Hernie ombilicale	Colonies crémeuses bombées et de couleurs vertes.
M30-5	Plaie purulente (infection du site opératoire).	L'appendice	Colonies crémeuses bombées et de couleurs vertes.
M30-6	Plaie ouverte (infection du site opératoire).	Péritonite	Colonies crémeuses bombées et de couleurs vertes.
G20-1	urine	Infection urinaire	Colonies de coloration verte claires crémeuses et bombées.
G20-2	urine	Infection urinaire	Colonies de coloration vertes claire crémeuses et bombées.
G20-3	urine	Infection urinaire	Colonies de coloration verte claires crémeuses et bombées.
G20-4	urine	Infection urinaire	Colonies de coloration verte claires crémeuses et bombées.
G20-5	urine	Infection urinaire	Colonies de coloration verte claires crémeuses et bombées.
G20-6	urine	Infection urinaire	Colonies de coloration verte claires crémeuses et bombées.
L10-1	Crachat	Broncho-pneumonie	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées.
L10-2	Crachat	Bronchite	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées
L10-3	Salive	Muguet	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées
L10-4	Crachat	Bronchiolite	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées

L10-5	Crachat	Rhino-pharyngite	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées
L10-6	Crachat fétide	Trachéite chronique	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées
L10-7	Salive	Oreillons	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées
L10-8	Crachat	Bronchite capillaire	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées
L10-9	Crachat	Amygdalite catarrhale pharyngée.	Colonies de coloration vertes-jaunâtres claires, crémeuses et bombées

VI-10-3-Estimation de la production de siderophores de type pyoverdine avant l'addition de sérum humain

La quantité des siderophores produites par les 30 souches isolées a été évaluée par la lecture de la DO à 400 nm des préparations spectrophotométriques. Les valeurs de dosage obtenues ont été extrapolées sur les graphiques (**Figures 30,31**). Le taux de la production de siderophores a été compris entre 0.13 et 3.25 $\mu\text{mol/ml}$, ainsi la production maximale a été attribuée à la souche **C33-2 (Tableau 18)**.

Tableau 18 : Concentration de siderophores produites avant l'addition du sérum humain.

LES SOUCHES

	B0S-0	BS0-1	BS0-2	C33-1	C33-2	C33-3	C33-4	C33-5	C33-6	M30-1
DO(0)	1.15	1.30	1.42	1.31	1.30	1.05	1.17	1.06	1.05	1.30
DO lue	0.06	0.07	0.09	0.07	0.05	0.06	0.1	0.05	0.08	0.08
[C]$\mu\text{mol/ml}$	2.39	2.32	1.97	2.33	3.25	2.18	1.46	2.65	1.64	2.03

	M30-2	M30-3	M30-4	M30-5	M30-6	G20-1	G20-2	G20-3	G20-4	G20-5
DO(0)	1.07	1.04	1.03	1.06	1.08	1.04	1.04	1.4	1.6	1.5

DO lue	0.08	0.01	0.09	0.01	0.07	0.01	0.11	0.18	0.09	0.09
[C]μmol/ml	1.67	0.13	1.43	0.13	1.92	0.13	1.18	0.97	2.22	2.08

	G20-6	L10-1	L10-2	L10-3	L10-4	L10-5	L10-6	L10-7	L10-8	L10-9
DO(0)	1.02	1.05	1.03	1.07	1.03	1.06	1.00	1.04	1.05	1.06
DO lue	0.06	0.05	0.08	0.07	0.09	0.06	0.09	0.06	0.08	0.09
[C]μmol/ml	2.12	2.62	1.60	1.91	2.14	2.20	1.38	2.16	2.34	1.47

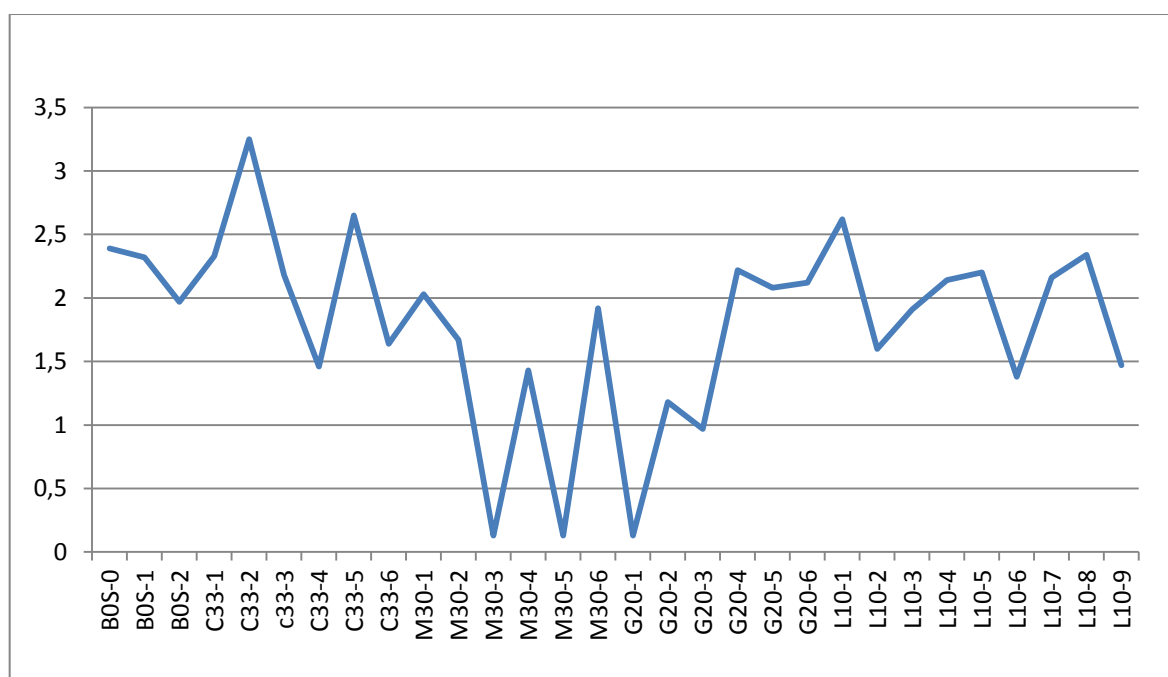


Figure 30: Concentration des siderophores de type pyoverdine produites par les souches testées avant l'addition de sérum humain.

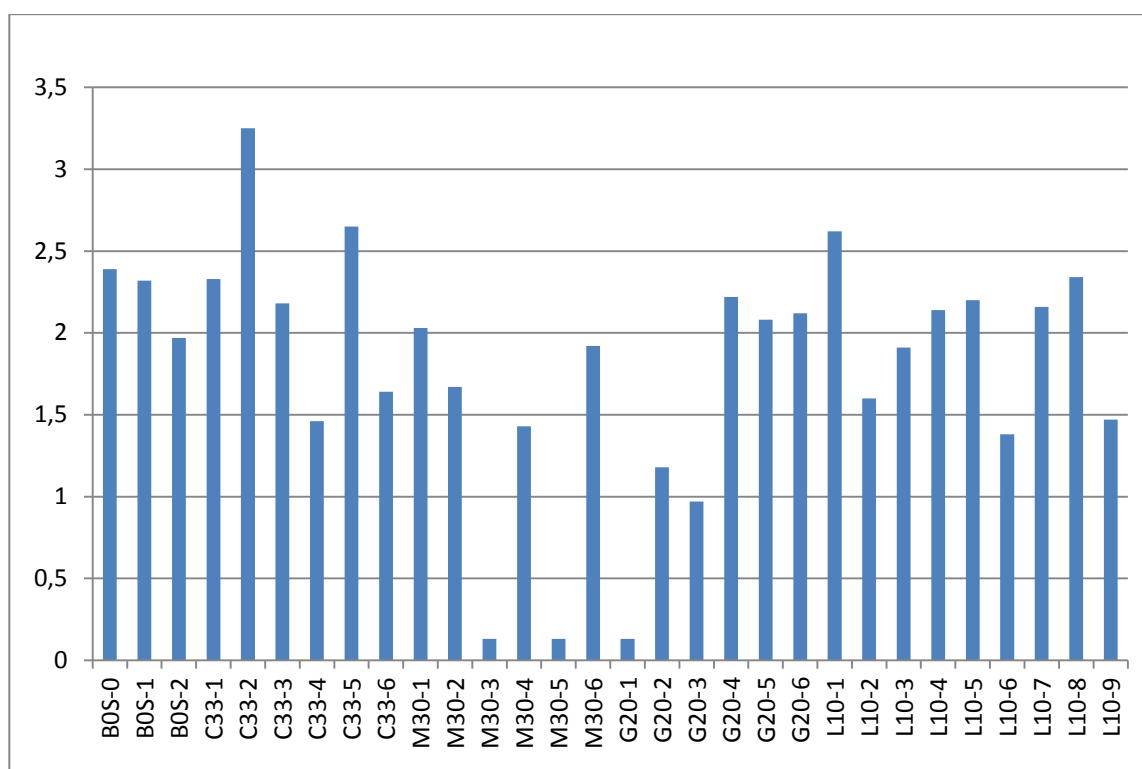


Figure 31 : Histogramme illustrant les concentrations des siderophores de type pyoverdine produites par les souches testées avant l'addition de sérum humain.

Pour vérifier ces résultats, on procède à une détermination de la concentration en protéines de la souche la plus performante C33-2 par dosage colorimétrique ; principe d'une gamme étalon et d'une droite étalon. La méthode colorimétrique la plus courante pour la détermination de la concentration en protéines est celle de **Marrion Bradford**.

✓ **Dosage des protéines par la méthode de Bradford.**

- **Principe :**

Le dosage de protéines par la méthode de Bradford utilise le réactif, dont le constituant principal est le bleu de Coomassie. Sous sa forme cationique libre, ce réactif absorbe la lumière à une longueur d'onde de 465nm. Lorsqu'il est mis en contact avec une solution protéique à doser, il se lie aux protéines présentes et aux groupements aromatiques ce qui a pour effet de déplacer sa principale raie d'absorption à 595nm. L'absorbance du rayonnement visible à 595nm est mesurée par un détecteur, et permet de doser indirectement la teneur en protéine de la solution à l'aide d'une courbe d'étalonnages BSA (Sérum Albumine Bovine). (**Beard JL ,2001**).

- **Protocole expérimental :**

Le protocole du fournisseur du réactif préconise d'insérer 5µL d'extrait à doser et de compléter

avec 250µL de réactif de Bradford. De la même façon, une courbe de calibration est réalisée pour étalonner le système.

La solution de concentration connue permet de constituer une gamme étalon : série de tubes qui contiennent un volume identique mais des quantités croissantes et connues de la protéine de référence (BSA). En parallèle, une série de tubes, contenant différents volumes de prise d'essai de la protéine dont on veut déterminer la concentration (l'échantillon à doser : Surnageant supposé contenir les siderophores), est préparée. La solution de réactif est ajoutée au même moment dans tous les tubes afin que la coloration se développe dans les mêmes conditions pour la gamme étalon et l'échantillon à doser. L'absorbance de tous les tubes est ensuite mesurée. Les valeurs obtenues à partir des tubes de la gamme étalon permettent de tracer une droite étalon : absorbance = f (quantités). Cette proportionnalité permet de déterminer la quantité de protéine contenue dans un volume de prise d'essai de l'échantillon à doser. On en déduit alors la concentration de la protéine à doser. **(Beard JL ,2001).**

La méthode de Bradford est donc une méthode d'analyse spectrophotométriques utilisée pour déterminer la concentration des protéines en solution. Il s'agit en fait d'un dosage colorimétrique au bleu de Coomassie ; selon la couleur de l'échantillon, l'absorbance va changer et il sera possible de déterminer la concentration de l'échantillon en comparant ces derniers avec des échantillons standardisés.**(Beard JL ,2001).**

Nous avons suivi la méthode décrite par **Meyer et Abdellah, 1978** pour le dosage des siderophores sur notre souche C33-2 ; nous avons juste procédé à un changement du temps de l'agitation et ce comme suit :

Prise d'essai	1	2	3	4	5
Temps d'agitation (heures)	42	48	30	36	12

Ces échantillons ont été dilués dans le réactif de Bradford, après le mélange, l'intensité de la coloration a été déterminée au spectrophotomètre à 465nm avec pour témoin le milieu GUM contenant seulement le réactif ; le sérum albumine bovine a été utilisé comme protéine de référence.

La mesure de l'absorbance entreprise à 465nm correspond à la fréquence de vibration de la liaison supposé être représentative de la quantité totale de protéines.

Absorbance en fonction de la concentration avec BSA Standard. $y = 53.945x$

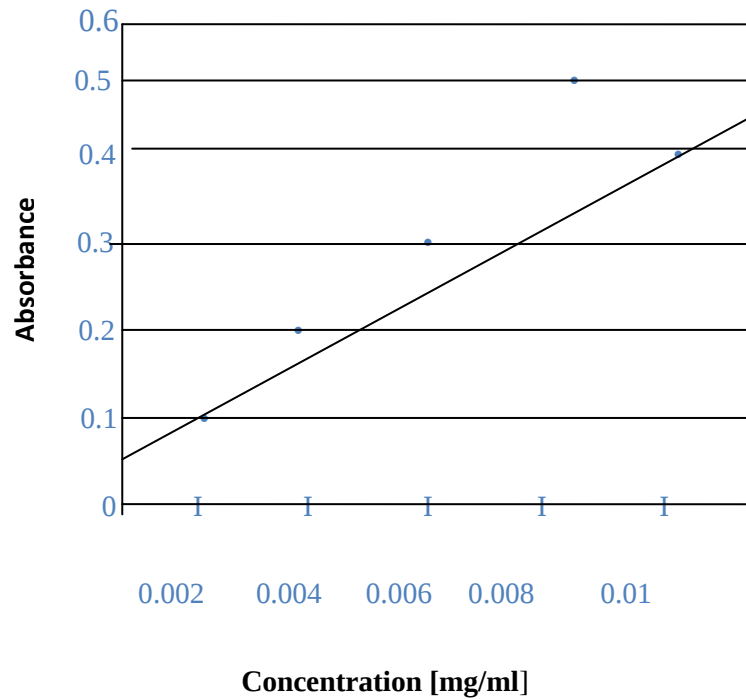


Figure 32 : La droite d'étalonnage obtenue après la lecture de la densité optique.

La courbe (**Figure 32**) devrait être linéaire mais ce n'est pas le cas, la non-linéarité de la pente est certainement due au BSA qui était trop vieux et donc détérioré. Il est aussi possible qu'un pourcentage d'erreurs intervient à cause des erreurs de pipetage.

Nous avons obtenu un tracé d'absorbance qui montre l'influence du temps de l'agitation préconisé par Meyer et Abdellah et qui est de 48 heures sur la synthèse de notre protéine. (Figure 33).

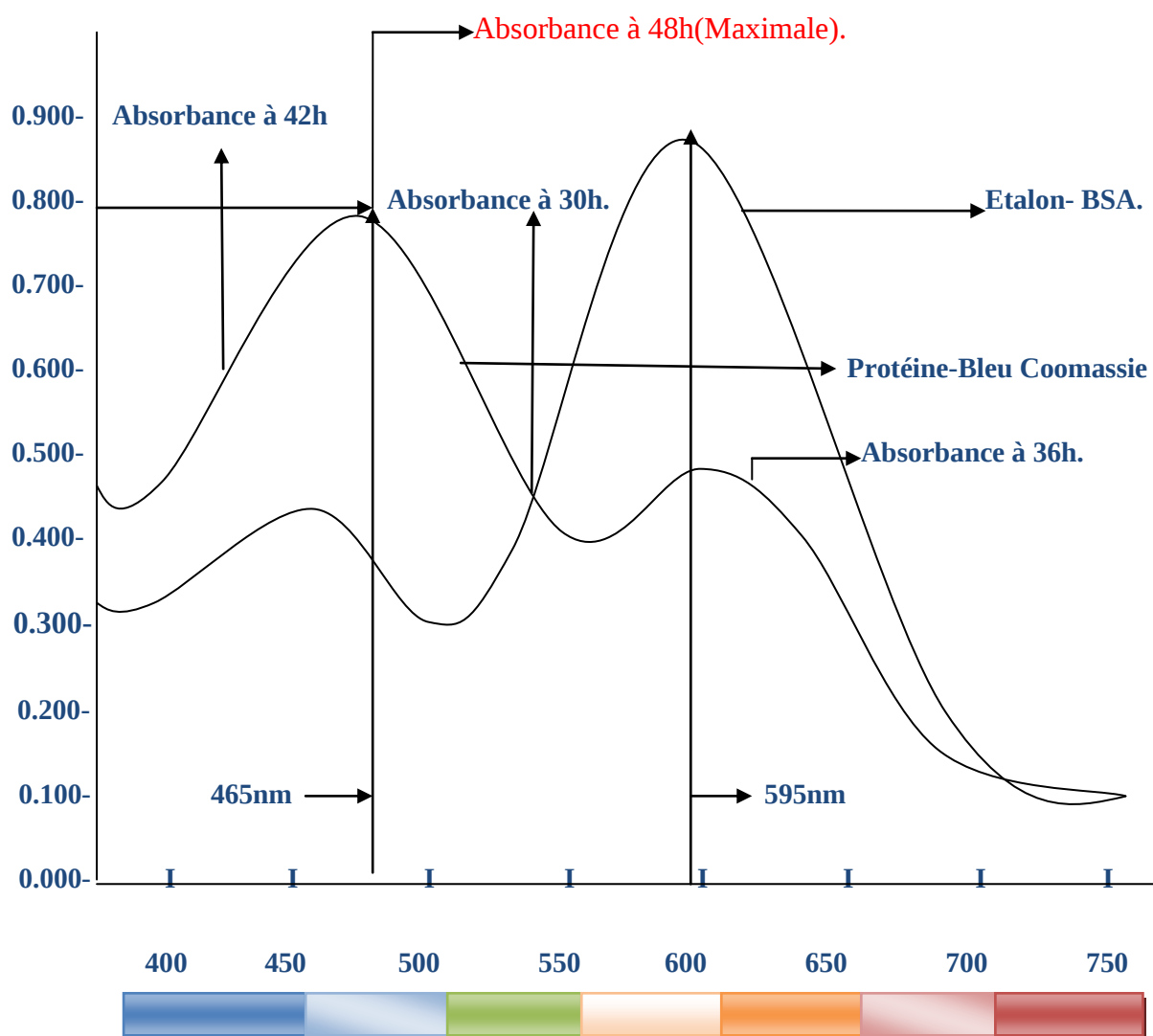


Figure 33 :Graphe comparatif entre l'absorbance de l'étalon et notre proteine-Bieu de coomassie . A

A 42h, l'absorbance est assez importante ;elle est maximale à 48h, puis elle diminue à 30h, remonte un peu à 36h pour atteindre un taux minimal à 12h. Ces resultats confirme la production des sidérophores après 48 h d'agitation selon le protocole de **Meyer et Abdellah,1978**.

V1-10-4-Estimation de la production de siderophores de type pyoverdine après l'addition de sérum humain.

La quantité des siderophores produites par les 30 souches isolées a été évaluée par la lecture de la DO à 400 nm des préparations spectrophotométriques. Les valeurs de dosage obtenues ont été extrapolées sur les graphiques (**Figure 34,35**). D'après nos résultats, nous constatons qu'il y'a une variation dans la concentration des siderophores après l'addition du sérum humain et ce comme suit : **B0S-0**(2.39 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.29 $\mu\text{mol/ml}$); **B0S-1**(2.32 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.11 $\mu\text{mol/ml}$); **B0S-2**(1.97 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1 $\mu\text{mol/ml}$.07); **C33-1**(2.33 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.57 $\mu\text{mol/ml}$);**C33-3** (2.18 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.29 $\mu\text{mol/ml}$); **C33-4**(1.46 $\mu\text{mol/ml}$ 1.41 μmo contre l/ml); **C33-5**(2.65 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.40 $\mu\text{mol/ml}$); **C33-6**(1.64 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.38 $\mu\text{mol/ml}$); **M30-1**(2.03 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.10);**M30-2**(1.67 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.18 $\mu\text{mol/ml}$); **M30-4**(1.43 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.08 $\mu\text{mol/ml}$),**G20-5**(2.08 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.4 $\mu\text{mol/ml}$ 1); **G20-6**(2.12 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.09 $\mu\text{mol/ml}$); **L10-1**(2.62 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.58 $\mu\text{mol/ml}$);**L10-3**(1.91 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.11 $\mu\text{mol/ml}$);**L10-4**(2.14 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.02 $\mu\text{mol/ml}$);**L10-5**(2.20 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.29 $\mu\text{mol/ml}$); **L10-7**(2.16 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.51 $\mu\text{mol/ml}$); **L10-8**(2.34 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.18 $\mu\text{mol/ml}$); **L10-9**(1.47 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.12 $\mu\text{mol/ml}$).Nous avons aussi remarqué une légère augmentation dans les concentration des siderophores concernant les souches : **M30-3**(0.13 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.22 $\mu\text{mol/ml}$); **M30-4**(1.43 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.08 $\mu\text{mol/ml}$); **M30-5**(0.13 $\mu\text{mol/m}$ contre l 1.69 $\mu\text{mol/ml}$); **M30-6**(1.92 $\mu\text{mol/ml}$ contre 3.26 $\mu\text{mol/ml}$);**G20-1**(0.13 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.37 $\mu\text{mol/ml}$); **G20-2**(1.18 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.67 $\mu\text{mol/ml}$); **G20-3**(0.97 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.54 $\mu\text{mol/ml}$);**L10-2**(1.60 $\mu\text{mol/ml}$ contre 2.85 $\mu\text{mol/ml}$);**L10-6**(1.38 $\mu\text{mol/ml}$ contre 1.52 $\mu\text{mol/ml}$); il s'agit peut-être d'une **Resistance**. La valeur maximale a été attribuée à la souche **C33-2**(3.77 $\mu\text{mol/ml}$) suivit des souches : **M30-6**(3.26 $\mu\text{mol/ml}$) et de la souche **L10-2**(2.85 $\mu\text{mol/ml}$) (**Tableau 19**).

Tableau 19 : Concentration de siderophores produites après l'addition du sérum humain

LES SOUCHES

	B0S-0	BS0-1	BS0-2	C33-1	C33-2	C33-3	C33-4	C33-5	C33-6	M30-1
DO(0)	1.45	1.70	1.7	1.64	1.81	1.55	1.47	1.46	1.55	1.59
DO lue	0.14	0.19	0.20	0.13	0.06	0.15	0.13	0.13	0.14	0.18
[C]$\mu\text{mol/ml}$	1.29	1.11	1.07	1.57	3.77	1.29	1.41	1.4	1.38	1.10

	M30-2	M30-3	M30-4	M30-5	M30-6	G20-1	G20-2	G20-3	G20-4	G20-5
DO(0)	1.71	1.47	1.73	1.63	1.83	1.54	1.47	1.48	1.63	1.58
DO lue	0.18	0.15	0.20	0.12	0.07	0.14	0.11	0.12	0.17	0.14
[C]$\mu\text{mol/ml}$	1.18	1.22	1.08	1.69	3.26	1.37	1.67	1.54	1.19	1.41

	G20-6	L10-1	L10-2	L10-3	L10-4	L10-5	L10-6	L10-7	L10-8	L10-9
DO(0)	1.14	1.65	1.83	1.70	1.73	1.55	1.46	1.45	1.52	1.62
DO lue	0.16	0.13	0.08	0.19	0.21	0.15	0.12	0.14	0.16	0.18
[C]μmol/ml	1.09	1.58	2.85	1.11	1.02	1.29	1.52	1.51	1.18	1.12

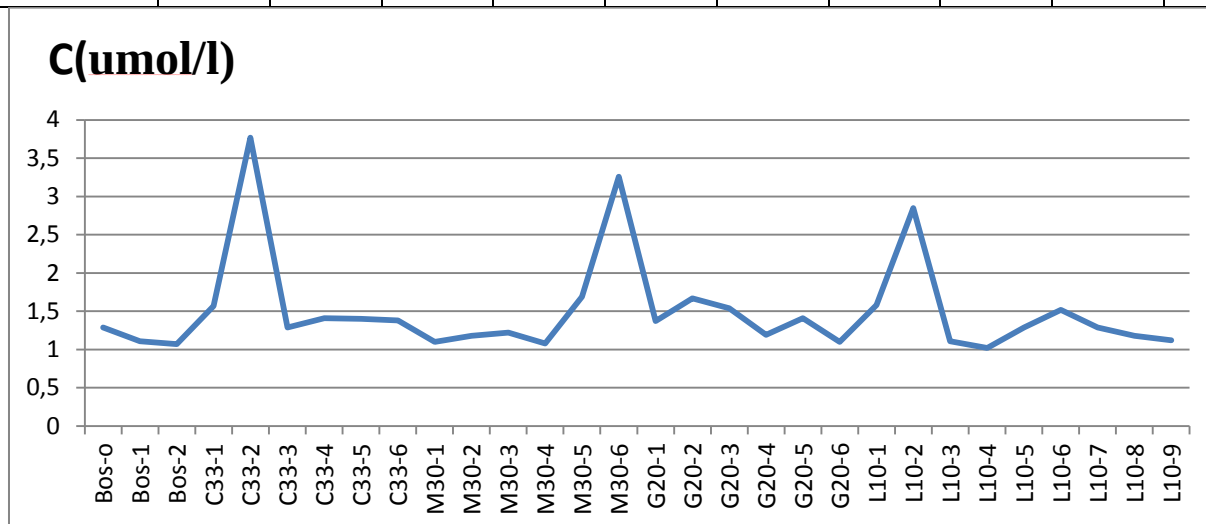


Figure 34 : Concentration des siderophores de type pyoverdine produites par les souches testées après l'addition de sérum humain.

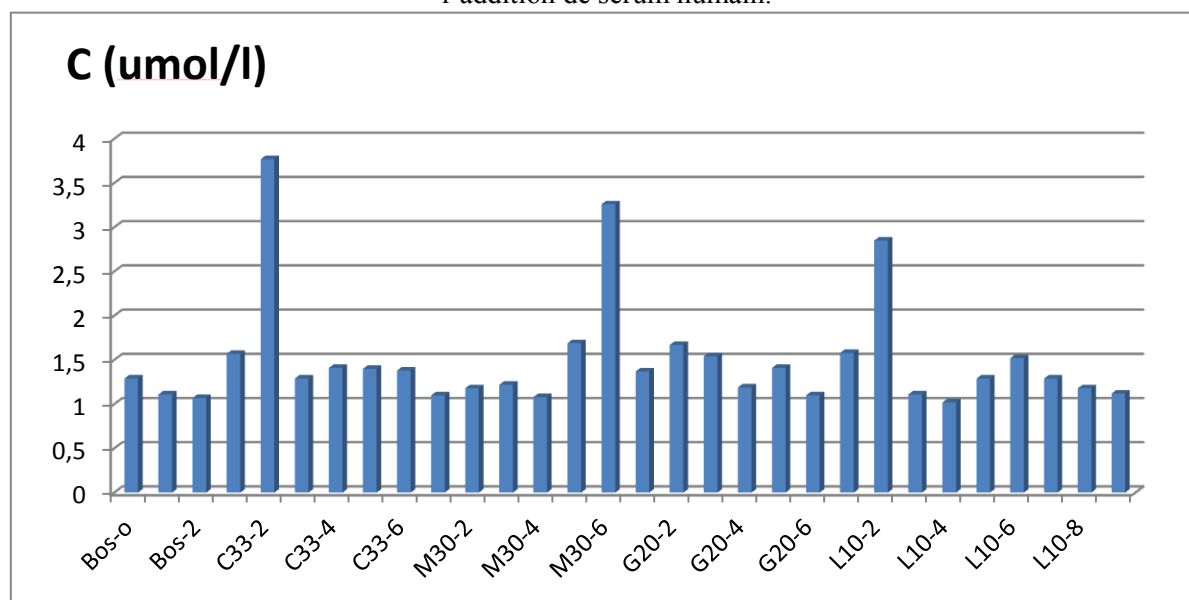


Figure 35 : Histogramme illustrant les concentrations des siderophores de type pyoverdine produites par les souches testées après l'addition de sérum humain.

Pour vérifier ces résultats, on réalise une cinétique de croissance bactérienne avant et après l'addition du sérum humain qu'on a supposé contenir le bactériostatique : le siderocalin et pour cela on a choisi la souche B0S-0 ; cette dernière est inoculée dans du milieu GUM avec agitation à 100 rpm. Des prélèvements à intervalles de temps régulier (chaque 2 heures) ont été effectués afin de suivre la cinétique bactérienne.

✓ Mesure de la densité bactérienne :

La variation de la densité bactérienne est déterminée par spectrophotométrie d'absorption UV à une longueur d'onde de 600nm de trajet optique avec le milieu GUM seul comme référence (**Figure 36**).

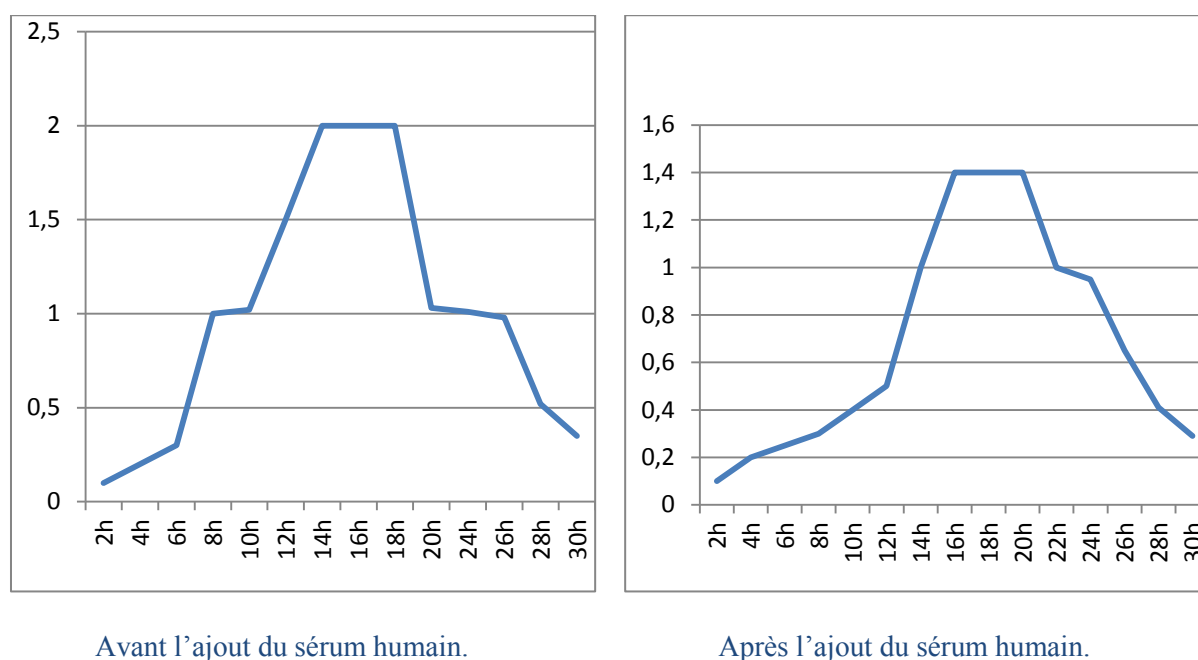


Figure 36: Graphe illustrant la cinétique bactérienne avant et après l'ajout du siderocalin.

Ce graphe illustre une variation dans la cinétique bactérienne après l'ajout du siderocalin par rapport à cette même cinétique avant l'ajout du siderocalin ; ce qui nous porte à dire que ce dernier a un effet sur la croissance bactérienne et confirme donc nos résultats.

- ❖ D'après la **Figure 35**, on a remarqué que la souche **C33-2** est celle qui a marqué le taux le plus élevé de production de siderophores de type pyoverdine dans les deux cas(en présence et en absence de sérum humain).

On a remarqué aussi que les souches **M30-6** et **L10-2**(**3.26** et **2.58** respectivement contre **1.92** et **1.60** dans le premier cas) ont exprimé un taux élevé de production de siderophores de type pyoverdine dans le deuxième cas (en présence de sérum humain).

VI-10-5-Identification des candidats retenus.

VI-10-5-1-Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies et diffusion des pigments.

Les 3 souches bactériennes (C33-2, M30-6 et L10-2) ont été mises en culture dans les milieux King B ; les résultats de l'observation de l'aspect des colonies et de la pigmentation après 24 h d'incubation à 30° C (observée sous une lampe UV à 366nm) sont représentés dans le **tableau 20**.

Tableau 20 : Aspects macroscopique des pigments sur le milieu King B.

Les souches				
Caractères	Milieux	C33-2	M30-6	L10-2
Couleurs des colonies	King B :	Vertes claires	Vertes claires	Transparentes
	Cétrimide :	Crème	Crème	Brillantes jaunâtres
Aspect des colonies	King B :	Petites et brillantes	Convexes et brillantes	Convexes et très brillantes
	Cétrimide :	Petites à bords réguliers	Petites et rigoureuses	Petites à bord réguliers
Couleurs des pigments	King B :	Jaunâtres	Vertes-jaunâtres	Vertes claires-jaunâtres
	Cétrimide :	Blanches-jaunâtres	vertes	Vertes-jaunâtres

Les 3 souches possèdent un aspect colonial presque identique avec une légère différence de couleurs.

L'observation de la fluorescence de ces souches sur les deux milieux de culture a permis de mettre en évidence la synthèse des pigments de couleurs presque identique ; les colonies des souches sélectionnées exposent une fluorescence vertes-jaunâtres sur le King B. Ainsi, ces souches détiennent la pyoverdine qui donne dans le milieu de culture le même type de fluorescence (verte-jaunâtre). **(Figures 37, 38,39)**

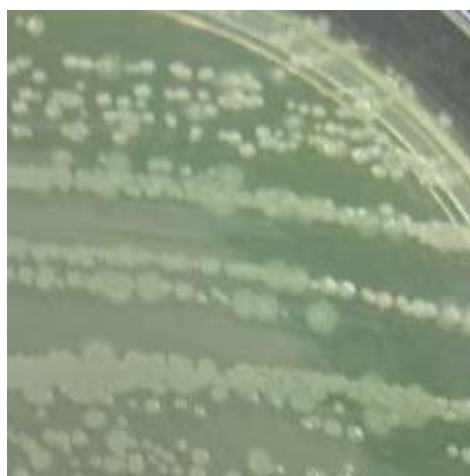


Figure 37 : Aspects des colonies de la souche C33-2 sur le milieu de King B.



Figure 38: Aspects des colonies de la souche M30-6 sur le milieu de King B.



Figure 39: Aspects des colonies de la souche L10-2 sur le milieu de King B.

VI-10-5-2-Observation microscopique à l'état fixé

L'observation des frottis fixés et colorés par la coloration de Gram sous microscope optique (GX 100) a permis de distinguer les formes cellulaires bactériennes des 3 souches retenues, ainsi que leur mode d'assemblage selon les résultats de cette coloration différentielle(**Figures 40 ,41 , 42**).

Les 3 souches observées sont des bacilles à Gram négatif, ayant pris une coloration «Rose» à l'issue de ce test, de taille identiques isolées ou groupées en chainettes avec des bords arrondis.



Figure 40 : Aspect microscopique pour la souche C33-2 après coloration de Gram.

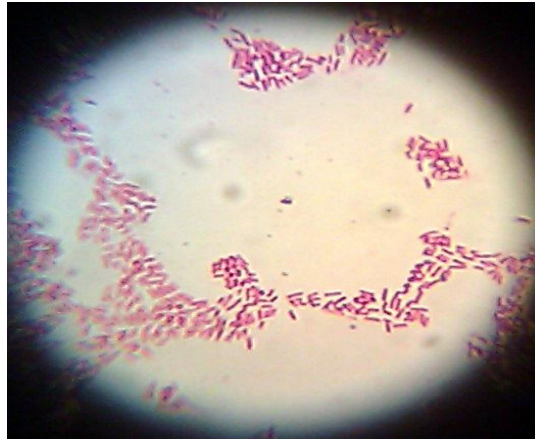


Figure 41 : Aspect microscopique pour la souche M30-6 après coloration de Gram

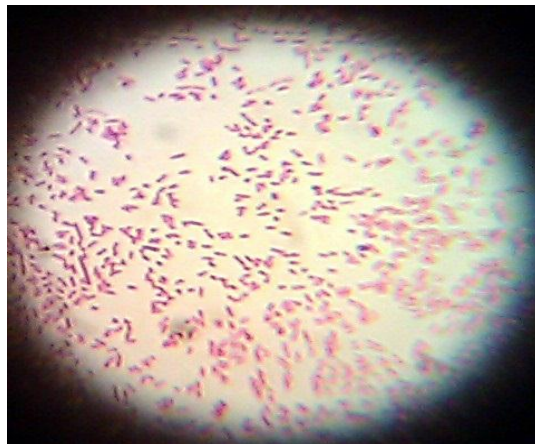


Figure 42 : Aspect microscopique pour la souche L10-2 après coloration de Gram.

VI-10-5-3-Détermination du type respiratoire, test de catalase et le test d'oxydase.

Le type respiratoire des bactéries est déterminé par la culture sur le milieu Viande-foie, les 3 souches se développent uniquement dans la partie supérieure du milieu contenu dans les tubes, ce sont de ce fait des bactéries aérobies strictes. **(Figure 43)**

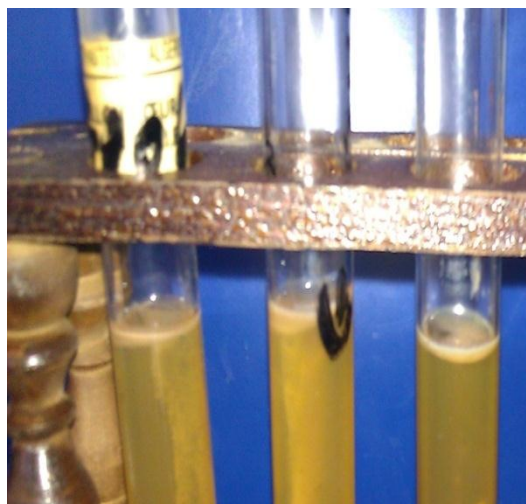


Figure 43 : Type respiratoire réalisé sur milieu VF des trois souches sélectionnées.

A l'issue du test catalase, la constatation d'un dégagement gazeux chez les 3 souches est la preuve d'une production de catalase, enzyme ayant servi à dégrader le composé cytotoxique : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), donc le dégagement gazeux témoignant d'une présence de catalase ; ces souches sont donc catalase+. (**Figure 44**)



Figure 44 : Test de catalase réalisé chez les trois souches les plus performantes.

Le test d'oxydase réalisé chez les trois souches les plus performantes ; prouve que ces derniers sont aérobies strictes. (**Figure 45**)



Figure 45 : Test d'oxydase réalisé chez les trois souches les plus performantes.

VI-10-5-4-Identification par la galerie API 20NE.

Les résultats obtenus après 24 h d'incubation des galeries ont été interprétés selon un tableau de lecture des profils biochimiques de la galerie(**Figure 46**).



Figure 46 : Résultat de la galerie après 24 h d'incubation réalisé sur la souche la plus performante C33-2.

Les résultats notés positifs ou négatifs sont introduits dans la grille des résultats du PIBwin, qui compare les résultats insérées avec celles enregistrés dans les matrices d'identification des espèces et donne une identification des espèces et une identification probable du taxon recherché avec un score d'identification suivi par d'autres taxons suspectées. (**Figures 47, 48**)

➤ L'interprétation du profil biochimique de la galerie.

Le programme suggère que cette souche est *Pseudomonas aeruginosa* et donne un score d'identification de 0.50247.

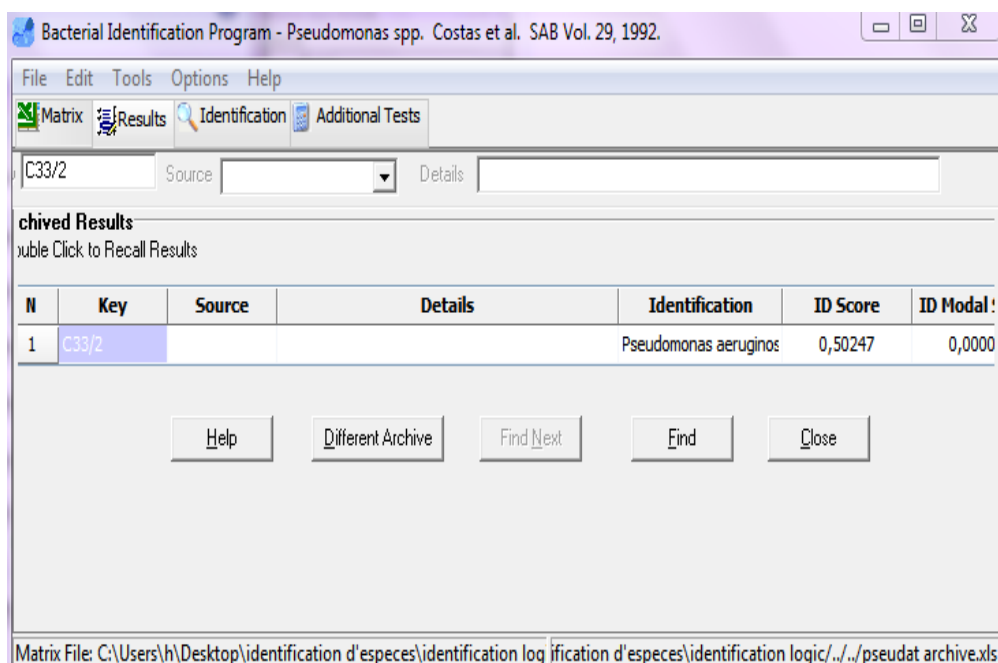


Figure 47 : Capture de fenêtre d'affichage de l'identification probabiliste de la souche C33-2 donnée par le Bacterial Identification Program.

Bacterial Identification Program - Pseudomonas spp. Costas et al. SAB Vol. 29, 1992.

File Edit Tools Options Help

Matrix Results Identification Additional Tests

C33/2 Source Details

Motility 37°	Motility RT	Growth 37°	Growth RT	Brown pig	Green pig	Yellow pig	Red pigme	Orange pi	MacConk	Oxidase	H &L oxide
+	+	+			+					+	
H &L alkal	Nitrate red	Simmons'	Christense	Urease	Gelatin sta	Gelatin ple	KCN	H2S pape	H2S TSI	Gluconate	Malonate
	+	+		+	-			+			
ONPG	PPA	Arginine di	Lysine dec	Ornithine c	PWS gluc	0.4% seler	Casein hyc	DNase	Glucose A	Adonitol A	Arabinose
		+							+		-
Cellobiose	Dulcitol A	Glycerol A	Inositol AS	Lactose A	Maltose A	Mannitol A	Raffinose	Rhamnose	Salicin AS	Sorbitol A	Sucrose A
					-	-					
Trehalose	Xylose AS	Ethanol A	Fructose A	Thornley's	Tween 20	Tween 80	Tyrosine h	Tyrosine p	Nitrite redu	PHBA gro	PHBA incl
									+		
Aesculin	Cetrimide	Fluorescer	Growth 5%	Growth 42	3-Ketolac	Lecithinas	Starch hvc	10% Gluc	10% Lact		

Matrix File: C:\Users\h\Desktop\identification d'especes\identification log ification d'especes\identification logic\../pseudat archive.xls

Figure 48: Capture de fenêtre de la grille d'identification de Bacterial Identification Program contenant les résultats obtenus pour la souche C33-2.

VI-10-6-Optimisation des facteurs de la production de siderophores réalisée sur la souche la plus performante : C33-2.

❖ Source de Carbone

A été entrepris en changeant le substrat (source de Carbone) et sa concentration ; les résultats obtenus ont été extrapolés sur les graphiques suivants :

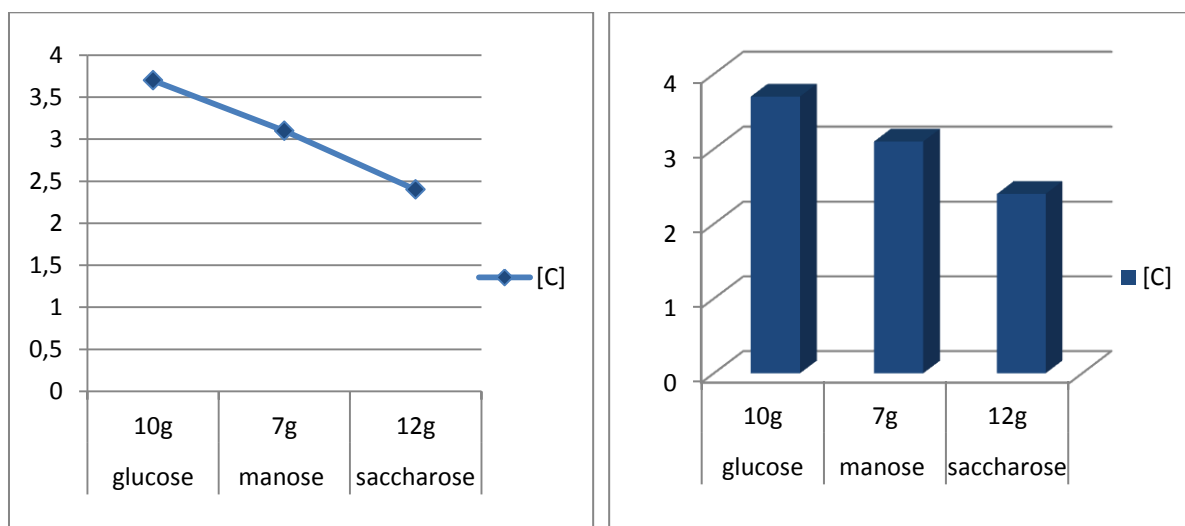


Figure 49 : Graphiques démontrants le taux optimal de source de Carbone dans la production de siderophores.

Ainsi, on peut constater qu'une production maximale de siderophores est réalisée en utilisant **le glucose** comme source de Carbone en raison de 10 g par litre de milieu de culture.

❖ Source d'Azote

A été aussi entrepris en changeant le substrat (source d'Azote) et sa concentration ; les résultats obtenus ont été extrapolés sur les graphiques suivants :

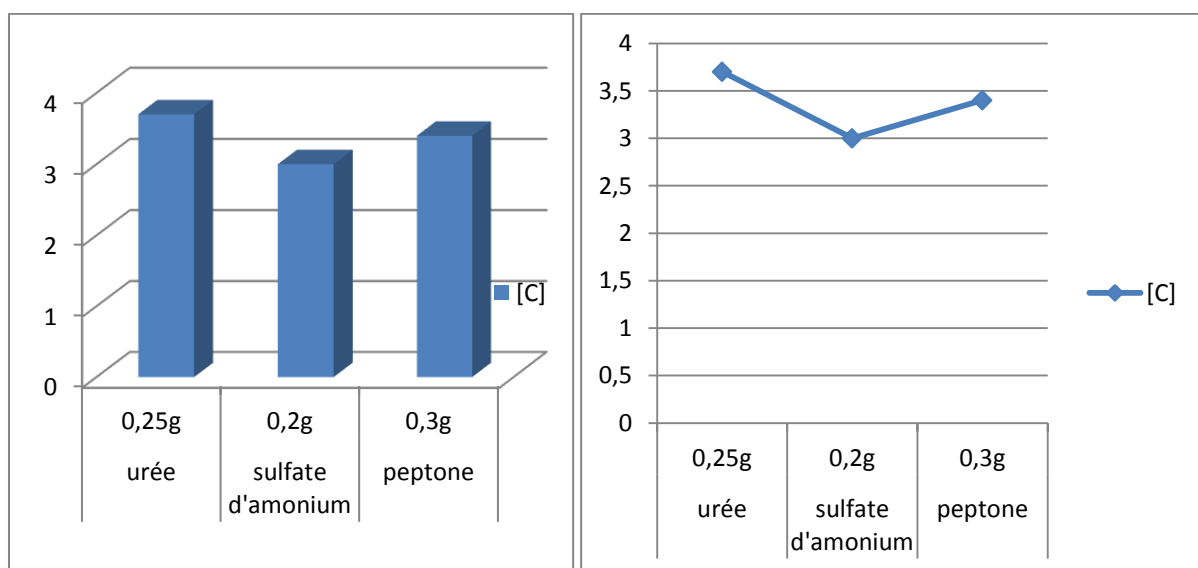


Figure 50 : Graphiques démontrants le taux optimal de source d'Azote dans la production de siderophores.

On remarque clairement qu'une production maximale de siderophores est réalisée en utilisant **l'urée** comme source d'azote à l'égard de **0.25 g** par litre de milieu de culture.

❖ Le pH :

A été aussi entrepris en changeant la valeur du pH. Les résultats obtenus ont été extrapolés sur les graphiques suivants :

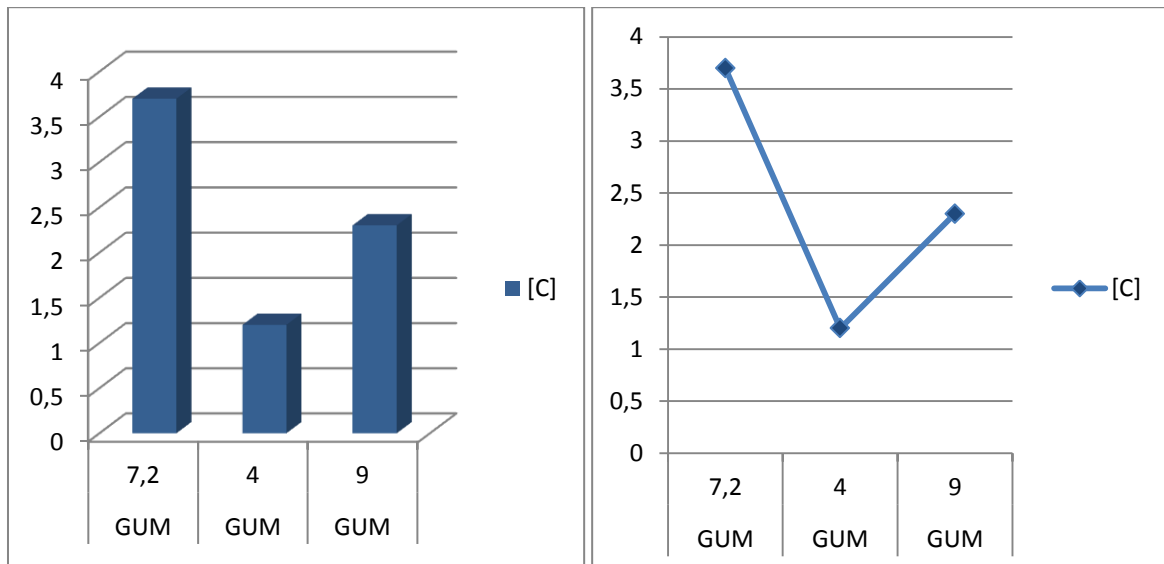


Figure 51 : Graphiques démontrants le pH optimal dans la production de siderophores.

Ces graphiques démontrent clairement que le pH optimal dans la production des siderophores est de 7,2.

VI-10-7-DISCUSSION GENERALE

La carence en fer est la carence la plus répandue au monde (COUSIN, 1991. KOUBAA ET *al*, 1993). Parmi les 1600 millions de cas d'anémie recensés, la moitié est d'origine ferriprive et on estime que le nombre de personnes carencées est 2 à 2,5 fois

6 mois, en raison de l'épuisement du stock de fer néonatal et de l'augmentation du volume sanguin et de la concentration en hémoglobine. La carence en fer est également favorisée à cet âge par la substitution du lait maternel par le lait de vache. Bien que le fer soit présent en concentrations à peu près équivalentes dans ces deux laits, sa biodisponibilité est d'environ 50% dans le lait maternel contre seulement 5% dans le lait de vache. Cette différence résulte en partie des propriétés de la lactoferrine humaine (**HERBERG, 1989**).

Si l'on se réfère à la définition de l'OMS en ce qui concerne les normes, le taux d'hémoglobine doit être inférieur à 11g/dl, en effet dans notre échantillon 50,5 % des enfants sont anémiques contre 49,5 % qui sont non anémiques.

Les pays en développement sont les plus touchés en raison de la faible biodisponibilité du fer dans l'alimentation, et de l'incidence élevée des maladies parasitaires dans certains pays (malaria et parasites intestinaux).

L'OMS estime que l'anémie touche 51% des enfants de 0 à 4 ans, 46% des enfants en âge scolaire, 42% des femmes (35 à 75% chez les femmes enceintes) et 26% des hommes (**BORDESSOULE, 1992**). En revanche, nos résultats sont en accord avec le pourcentage estimé par l'OMS.

La carence en fer est un trouble systémique qui nuit à l'endurance physique, à la capacité de travail, à la croissance et au développement du nourrisson ainsi qu'à une inhibition de la fonction immunitaire. Parmi ces troubles, c'est l'association entre la carence en fer et le développement de l'enfant qui attire le plus d'attention de la part des chercheurs (**BORDESSOULE, 1992**).

Des réserves en fer appauvries dans le cerveau peuvent nuire à l'activité des enzymes qui dépendent du fer et qui sont nécessaire à la synthèse, à la fonction et à la dégradation des neurotransmetteurs tels que la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline, lesquels sont responsables de changements de comportement et d'une diminution des indices aux tests de développement chez les enfants (**BORDESSOULE, 1992**).

D'après notre étude, l'âge des patients ne semble pas avoir d'effet sur les paramètres hématologiques car nous n'avons révélé aucune corrélation entre l'âge et le taux d'hémoglobine ($r = -0.016$).

Selon notre étude le taux de Neutrophile présente une différence significative entre les enfants anémiques (**le groupe d'étude**) et les enfants non anémiques (**le groupe témoin**). Ce qui explique l'effet de la carence en fer sur l'immunité cellulaire.

La carence en fer semble associée à des perturbations des défenses immunitaires. L'impact du déficit en fer sur le système immunitaire n'est pas encore bien compris. D'après les données actuelles, la carence en fer altérerait la fonction bactéricide des polynucléaires, en raison de la perturbation de certains processus enzymatiques. Elle affecterait aussi le fonctionnement des lymphocytes T.

Nos résultats révèlent que les taux des IgG, IgD, IgA et IgM présentent une différence significative hautement élevée entre les deux groupes (**étude et témoin**). Par contre le taux des IgE, ne présente aucune différence significative.

En effet, le fer est un élément essentiel des enzymes générateur de peroxyde d'azote et l'oxyde pour générer des enzymes qui sont essentiels pour le bon fonctionnement enzymatique des cellules immunitaires. Enfin, le fer est vraisemblablement impliqué dans la régulation de la production de cytokines et le mécanisme d'action à travers son influence sur les systèmes de second messenger (**HERSHKO, 1996**). Dans l'une des rares études du rôle de la nutrition en fer dans le développement du système immunitaire, un retard a été noté dans le développement de l'immunité à médiation cellulaire (**KOCHANOWSKI et al, 1985**). En revanche une forte corrélation a été relevée dans notre étude entre les IgG et quelques paramètres du statut en fer (fer sérique, Ferritine, Hb, VGM, TCMH, CCMH, Ht).

Chez les animaux adultes ou chez l'homme avec le système immunitaire est intact, l'immunité non spécifique est affectée par la carence en fer de plusieurs façons. Phagocytose des macrophages est généralement affectée par la carence en fer, mais l'activité bactéricide de ces macrophages est atténuée (**HALLQUIST ET al, 1992**). Les neutrophiles ont une activité

réduite de l'enzyme, la myéloperoxydase contenant du fer, qui produit de l'oxygène réactif intermédiaires responsables de la destruction intracellulaire des pathogènes (**SPEAR ET al, 1992**). Il y a une diminution en nombre des lymphocytes T et des lymphocytes T blastogénèse et mitogénèse une carence en fer en réponse à un certain nombre de différents mitogènes. Cette altération est en grande partie corrigée par la réplétion de fer (**KUVIBIDILA ET al, 1999**. **SPEAR ET al, 1992**). Des études récentes des lymphocytes T dans la carence en fer a noté que la protéine kinase C et la translocation de l'activité à la fois les cellules T spléniques et purifié a été modifiée par la carence en fer (**KUVIBIDILA ET al, 1999**). D'autre part, d'autres ont trouvé une réponse normale des lymphocytes T proliférative aux mitogènes (**CANONNE ET al, 1999**).

Il ya plusieurs mécanismes qui pourraient expliquer les effets de la carence en fer sur le système immunitaire. Synthèse de l'ADN, initiée par la Ribonucleotide réductase enzyme contenant du fer, est un facteur limitant la vitesse dans la réplication cellulaire et peut être limitée par une carence en fer. Contrôle de la différenciation des cellules est influencée par le fer et le transport du fer dans les cellules via le récepteur de la transferrine. GALAN et ses collègues (1992) ont rapporté une réduction dans la production d'interleukine-2 par les lymphocytes activés chez les sujets carencés en fer. La libération d'interleukine-2 est fondamentale à la communication entre les sous-populations lymphocytaires et les cellules tueuses naturelles, mais il ne semble pas être la cytokine seulement qui est modifiée par le statut en fer (**SUSSMAN, 1974**).

Notre deuxième étude a été portée sur un échantillon constitué de 626 enfants présentant des infections diverses et notamment respiratoires.

Nous avons constaté la présence de *Pseudomonas* à travers les cultures ; constatation basée sur des caractères phénotypiques (colonies caractéristiques, odeur, fluorescence sous UV).

Dans cette étude, 30 souches bactériennes du genre *Pseudomonas* ont été isolées en milieu hospitalier à partir d'enfants souffrants d'infections diverses et testés in vitro pour leur effet producteur de siderophores chélateurs de fer.

Une évaluation du taux de siderophores accumulé par 30 les souches bactériennes isolées a été effectuée en se basant sur le protocole établi par **Meyer et Abdellah, 1978** dont l'intensité est mesurée avec spectrophotomètre à une longueur d'onde égale à 400 nm. Les résultats obtenus ont montré qu'il y a une différence remarquable de production chez les 30 isolats qui est peut-être due à la différence de l'origine de ces isolats et leur patrimoine génétique différent. Selon le Bacterial Identification Program, la souche C33-2 est une *Pseudomonas aeruginosa* avec un score, d'identification de 0.50247. le taxon proposé par le logiciel correspond parfaitement aux profils biochimiques obtenus.

Comme de nombreuses bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* va synthétiser et sécréter ses propres siderophores : la pyoverdine qui est un siderophores majeur pour la survie et la virulence de cette bactérie mais va aussi pouvoir exprimer la machinerie nécessaire à l'utilisation de siderophores produites par d'autres organismes ; ceci lui permet d'être particulièrement compétitive pour l'acquisition du fer (**Meyer, 2000**). En plus des siderophores endogènes *Pseudomonas aeruginosa* peut également utilisé un certains nombre de siderophores hétérologues d'origine bactérienne ou fongique ce qui lui procure un avantage adaptatif certain(**Mislin et al, 2006**).

Chez les humains, le fer est complexé à divers protéines le rendant ainsi très peu disponible pour les bactéries. La capacité des bactéries à obtenir le fer nécessaire à leur croissance et leur prolifération dans un organisme est considérée comme un déterminant de virulence important. Afin de contrer cette immunité nutritionnelle, plusieurs systèmes de siderophores sont nécessaires pour la virulence des diverses bactéries pathogènes (**CANONNE ET al, 1999**).

En **2002**, le groupe de **Strong** a démontré que le Siderocalin ou encore connu sous le nom de NGAL soit «Neutrophile Gelatinase Associated Lipocalin» séquestre fortement les siderophores. **Strong** et ses collaborateurs ont d'ailleurs démontré l'effet bactériostatique du siderocalin.

Nos résultats ont montré l'existence d'une variation dans la concentration des siderophores après l'addition du sérum humain supposé contenir le siderocalin ; on a aussi remarqué que 3 souches ont exprimé un taux élevé de la production de siderophores après l'ajout du sérum

humain par rapport au premier cas (avant l'addition du sérum humain). Nous pensons qu'il s'agit d'une résistance bactérienne.

Puisque l'obtention du fer est un processus important pour la prolifération bactérienne ; plusieurs études sur l'importance des divers systèmes de siderophores pour la virulence des souches bactériennes pathogènes ont été réalisées. Cependant l'importance de ces systèmes pour la prolifération bactérienne varie selon les souches ; une modification du taux de siderophores par une glycotransférase ajoutant des molécules de glucose empêche le **NGAL** de séquestrer les siderophores modifiés en plus d'éviter le déclenchement d'une réponse pro-inflammatoire par l'interleukine-8 ; c'est ce qu'a constaté **Hank en 2003**, qui a découvert des Salmochélines qui sont en fait des siderophores modifiés ; ceci peut-être **une première explication** en ce qui concerne la résistance de quelques unes de nos souches à l'ajout du siderocalin.

Une deuxième explication peut-être l'utilisation des antibiotiques en milieu hospitalier qui peut créer une pression de sélection constante sur les bactéries et engendrer inévitablement des résistances et la création ainsi de souches résistantes **CANONNE ET al**, 1999).

La troisième explication est liée à l'hôte, car plusieurs facteurs de celui-ci peuvent venir interférer dans la production des siderophores. Les défenses naturelles de l'hôte dont le rôle est de séquestrer le fer libre ou complexé justifiant en quelque sorte la variété, le nombre et la modulation de l'expression des systèmes d'obtention du fer présent chez de nombreuses bactéries pathogènes (**CANONNE ET al**, 1999).

L'anémie ferriprive (par carence en fer, ou carence martiale) est le trouble nutritionnel le plus répandu dans le monde; elle abaisse le pouvoir immunitaire et diminue les capacités physiques et mentales des populations. Même modérée, elle peut affecter le développement intellectuel chez les nourrissons et les jeunes enfants.

Les enfants en bas âge et les femmes en âge de procréer représentent, dans tous les pays, des groupes à haut risque de la carence martiale. Les difficultés sociales, politiques et économiques que connaît l'Algérie depuis plusieurs années, rendent pratiquement impossible le dépistage de l'anémie carencielle au niveau des unités de santé primaire. La prévention de cette maladie ne peut s'envisager que par l'éducation nutritionnelle en faveur d'un régime alimentaire équilibré du nourrisson et par la supplémentation systématique en fer des femmes au cours de la grossesse et des nouveau-nés à risque à partir de l'âge de deux mois et pendant toute la première année de la vie.

L'acquisition du fer est un domaine d'étude important de la pathogénèse bactérienne. Bien que ce métal soit un élément essentiel au métabolisme bactérien, il n'existe à l'heure actuelle aucune molécule antibiotique qui cible spécifiquement l'une des composantes des systèmes d'approvisionnement en fer.

Notre étude n'a ainsi aucunement la prétention de découvrir un véritable antibiotique *sensu stricto*, nous espérons cependant que les inhibiteurs comme le siderocalin soient capables de potentialiser l'action d'antibiotiques reconnus en affaiblissant la population bactérienne. Cette stratégie a d'ailleurs été envisagée pour le traitement de formes résistantes de peste ou de tuberculose.

ANNEXE ET GLOSSAIRE

Questionnaire type

Nom :

Prénom

Sexe

Age

Niveau d'instruction

L'analyse de l'hémogramme :

GR:

GB:

Hb:

Ht:

TCMH:

CCMH :

VGM :

L'analyse biochimique :

Fer sérique :

Ferritine :

L'analyse immunologique :

Dosage des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)

Type d'infection

ECB des urines

Résultat coproculture

Bactérie responsable

GLOSSAIRE

Hémoglobine :

L'hémoglobine (Hb) sanguine correspond à la quantité d'hémoglobine contenue dans 100 ml de sang. Elle varie en fonction du sexe et les valeurs normales sont:

Chez l'homme : 13 à 18 g/dl,

Chez la femme : 12 à 16 g/dl.

Chez les enfants (de 1 à 5ans): 11 à 13 g/dl.

Le nombre de globules rouges

Il s'agit du nombre de globules rouges par mm^3 . Les valeurs normales sont :

Chez l'homme : 4,2 à 5,7 Millions par microlitre,

Chez la femme : 4,0 à 5,3 Millions par microlitre.

Chez l'enfant (de 1 à 5ans) : 4,0 à 5 Millions par microlitre.

Hématocrite

Il s'agit de la répartition (exprimée en %) des globules rouges par rapport au plasma, la quantité de globules blancs et de plaquettes ne rentrant pas en ligne de compte car en quantité très petite). Lorsque l'hématocrite est égal à 40%, cela signifie que 100 ml de sang contient 40 ml de globules rouges et 60ml de plasma).

Les valeurs normales sont : -Chez l'homme : 40 à 52%,

-Chez la femme : 37 à 46%

-Chez les enfants (de 1 à 5ans) : 37 à 45 %.

Comme l'hématocrite correspond à un volume, si on divise l'hématocrite par le nombre de globule rouge on obtient le volume moyen des globules rouges. C'est le Volume Globulaire Moyen (VGM). Il est exprimé en μ^3 . Il s'agit d'une valeur moyenne, la taille des globules rouges peuvent varier (anisocytose).

Le VGM est normalement compris entre 80 et 100 μ^3 . Sous le seuil de 80, on parle de **microcytose** et au dessus de 100 de **macrocytose**.

Chez les enfants (de 1 à 5 ans) il est de 77 à 91 μ^3 .

La CCMH

La concentration corpusculaire (ou globulaire) moyenne en hémoglobine (CCMH) correspond à la quantité d'hémoglobine contenu dans 100 ml de globules rouges. Ce paramètre est obtenu en faisant le rapport entre Hémoglobine/Hématocrite. Il est exprimé en gramme/100ml ou en %. Les valeurs normales varient entre 32 et 36%.

Lorsque la CCMH est inférieure à 32% on parle **d'hypochromie**. Au dessus on parle de **normochromie**. Le taux maximal de la CCMH est de 38% (arrêt de la synthèse de l'hémoglobine dans l'érythroblaste à partir de ce taux).

Chez les enfants (de 1 à 5ans) il est de 31 à 35 %.

La TCMH

Paramètre moins utile, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) est calculée par le rapport hémoglobine/nombre de globules rouges contenus dans 100 ml de sang. Elle est normalement comprise entre 27 et 31 pg/GR.

Chez les enfants (de 1 à 5ans) il est de 24 à 30 pg.

Globules blancs

Le nombre normal des leucocytes varie entre 4 et 10 G/L (correspond à $4-10 \times 10^9/L$ ou 4000-10000/mm³). En dessous de 4000/mm³ on parle de leucopénie et au dessus de 10000/mm³ d'hyperleucocytose. Plus que le chiffre total de leucocytes c'est la formule leucocytaire qui importe.

Chez les enfants (de 1 à 5ans) il est de 5000 à 11000/mm³.

Plaquettes

Les plaquettes sont utiles à l'hémostase primaire (clou plaquettaire). Leur taux habituel varie de 150 000 à 450 000 /mm³ ($150 \text{ à } 450 \times 10^9/L$ ou 150 à 450 g/L). Sous la valeur de 150 G/L on utilise le terme de thrombopénie ; au dessus de la valeur de 450 g/L on parle de thrombocytose (ou d'hyperplaquettose).

Chez les enfants (de 1 à 5ans) il est de 120 000 à 400 000/mm³.

Fer sérique

Le fer sérique est le taux de fer en circulation libre dans le plasma sanguin et non fixé à l'hémoglobine des globules rouges. Le taux normal pour l'enfant (de 1 à 5 ans) est de 58 à 158 µg /100ml.

Ferritine

Est une protéine permettant le stockage du fer. Elle joue un rôle clé dans son métabolisme, permettant de réguler l'absorption intestinale du fer en fonction des besoins de l'organisme. Elle a ainsi une fonction de réserve et de détoxication du fer. Le dosage de la ferritine plasmatique est le reflet des réserves tissulaires mobilisables. Son dosage permet d'évaluer les réserves en fer et ainsi de dépister précocement une carence en fer ou à l'opposé d'apprécier une remontée des réserves lors d'un traitement par supplémentation ferrique.

La valeur normale : - Chez l'homme : 20 à 250 µg/l.

-Chez la femme : 20 à 200 µg/l.

- Chez les enfants (de 1 à 5ans) : 7 à 140 µg/l.

Immunoglobulines

► *Les IgA : elles sont fabriquées par les cellules de défense situées dans les muqueuses . C'est pourquoi on les trouve surtout dans les sécrétions au niveau des orifices et des canaux : le nez, la gorge, la trachée , les bronches. Le taux normal chez l'enfant (de 1 à 5 ans) est de 80 à 440 mg/100ml.*

► *Les IgD : elles interviennent dans l'immunité pour aider les lymphocytes à agir contre les agents infectieux. Le taux normal chez l'enfant (de 1 à 5 ans) est de 0,3 à 14 mg/100ml.*

► *Les IgE : elles jouent un rôle essentiel dans la réaction allergique en provoquant la libération d'histamine par les cellules de l'immunité. Le taux normal chez l'enfant (de 1 à 5 ans) est de 0,006 à 0,6 mg/100ml.*

► *Les IgM : ce sont les immunoglobulines envoyées en première intention quand un agresseur pénètre dans l'organisme. Ces molécules sont en quelque sorte les fantassins de l'immunité. Le taux normal chez l'enfant (de 1 à 5 ans) est de 50 à 200 mg/100ml.*

► *Les IgG : elles interviennent soit lorsque l'agresseur n'est pas éliminé directement par les IgM, soit lors d'un deuxième contact avec ce même agresseur. Ce sont donc les molécules mémoire de l'immunité. Le taux normal chez l'enfant (de 1 à 5 ans) est de 650 à 1500 mg/100ml.*

Neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont les plus nombreux des globules blancs du sang, ils représentent 50 à 70% des leucocytes circulants dans le sang, ils ont une forme plus moins ovale et leur cytoplasme contient des granules pour la destruction des cellules porteuses d'antigènes du non-soi et leur action concerne essentiellement les bactéries, cette destruction se fait par phagocytose

Le taux normal chez les enfants (de 1 à 5ans) est de : 45 à 70%.

Basophiles

Sont les moins nombreux des leucocytes circulants, ils représentent moins de 0,5%, ils sont caractérisés par des granulations de coloration violette qui contiennent de l'histamine (substance libérée au cours des réactions allergiques)

Le taux normal chez les enfants (de 1 à 5 ans) est de 0 à 1%

Eosinophiles

Ils augmentent dans le processus allergique en libérant des substances qui vont lutter contre les effets de l'histamine, ils ne représentent que 1,5% de l'ensemble des globules blancs. Ils contiennent des granulations plus grosses. Ils phagocytent également le complexe antigène-anticorps.

Le taux normal chez les enfants (de 1 à 5 ans) est de 1 à 3%.

Monocytes

Les monocytes sont les cellules les plus volumineuses, ils représentent 2 à 10 % des leucocytes du sang. Ils sont présents dans certains tissus et réalisent la phagocytose.

Le taux normal chez les enfants (de 1 à 5 ans) est de 3 à 7%.

Lymphocytes

Sont les seules cellules à avoir une spécificité d'action (ce qui les rend plus efficaces que les cellules non spécifiques que sont les neutrophiles et les macrophages), permettant la connaissance de n'importe quel antigène du non-soi, on a deux sortes de lymphocyte: les lymphocytes B et les lymphocytes T. Ils représentent environ 25% de la population totale des globules blancs.

Le taux normal chez les enfants (de 1 à 5 ans) est de 20 à 40%.

Retrouve l'ensemble des phénomènes qui maintiennent le nombre de GR et le taux de l'Hb dans les limites physiologique.

Erythropoïétique

Est une hormone qui assure en fonction des besoins, la différenciation des cellules souches déterminées de la lignée rouge en proérythroblastes ; elle contribue aussi au contrôle de la synthèse de l'Hb dans les érythroblastes jeunes.

Sidérophiline

Ou transferrine. Protéine du sang qui fixe le fer et le transporte vers les différents organes.

Erythroblaste

Cellule de la moelle osseuse, spécialisée dans la synthèse de l'hémoglobine et donnant naissance au globule rouge.

Hémorragie

Une hémorragie est un écoulement de sang causé par la rupture d'un vaisseau sanguin. Lorsque cet écoulement se produit à l'intérieur du corps on parle d'hémorragie interne. Lorsqu'il se produit à l'extérieur du corps on parle d'hémorragie externe.

Hémolyse

Rupture ou destruction des érythrocytes.

Aménorrhée :

C'est l'absence de règles. La non apparition des règles chez la jeune fille (aménorrhée primaire) ou la disparition des menstruations (aménorrhée secondaire) chez la femme (en dehors de la ménopause) sont des éventualités relativement fréquentes.

ANNEXE 2

Milieux de culture

1-Milieu bouillon nutritif

Composition par litre :

<i>Extrait de levure</i>	<i>04g</i>
<i>Tryptone</i>	<i>05g</i>
<i>Glucose</i>	<i>50g</i>
<i>Dihydrogénpphosphate de potassium</i>	<i>0.55g</i>
<i>Chlorure de potassium</i>	<i>0.425g</i>
<i>Chlorure de calcium</i>	<i>0.125g</i>
<i>Sulfate de magnésium</i>	<i>0.125g</i>
<i>Chlorure ferrique</i>	<i>0.025g</i>
<i>Sulfate de manganèse</i>	<i>0.025g</i>
<i>Vert de bromocrésol</i>	<i>0.022g</i>
<i>pH5.5±0.2</i>	

2-Gélose au Cétrimide

Composition par litre

<i>Peptone de gélatine</i>	<i>16g</i>
<i>Peptone de caséine</i>	<i>10g</i>
<i>Bromure de tétradonium</i>	<i>0.2g</i>
<i>Acide nalidixique</i>	<i>15mg</i>
<i>Sulfate de potassium</i>	<i>10g</i>
<i>Chlorure de magnésium</i>	<i>1.4g</i>
<i>Agar</i>	<i>10g</i>
<i>pH7.1</i>	

3-Gélose King B

Composition par litre

<i>Proteose peptone N03</i>	<i>20g</i>
<i>K₂HPO₄, anhydre</i>	<i>1.5g</i>
<i>MgSO₄; 7 H₂O</i>	<i>1.5g</i>
<i>Glycérol</i>	<i>15ml</i>
<i>Agar purifié</i>	<i>12g</i>
<i>pH7.2±0.2 à 25°C</i>	

4-Milieu VF (Viande-Foie)

Composition par litre

<i>Base viande foie</i>	<i>30g</i>
<i>Glucose</i>	<i>0.2g</i>
<i>Agar</i>	<i>6g</i>
<i>pH7.0</i>	

5-Milieu Glucose Urée (GUM)

Composition par litre

Glucose anhydre 10g

Urée 0.25g

K₂HP0₄ 0.26

pH 7

T°=25°C

ANNEXE 3

Procédure d'utilisation de la galerie API 20NE.

1-Principe

La galerie API 20 NE est constituée de 20 micro- tubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et d'identification.

2-Technique

2-3-Préparation de la galerie

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

2-4-Préparation de l'inoculum

Faire une suspension bactérienne dans une ampoule de Na Cl 0.85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0.5 Mac Ferland.

2-5-Inoculation de la galerie

Remplir les tubes (et non les cupules) des tests N03 à PNPG avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles.

*Transférer 200µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente dans une ampoule AUX Medium. Homogénéiser ; remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC. Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests : **GLU ADH URE**. Incuber 24 h à 30°C.*

3-Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de lecture. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs.

Présentation des principales fonctionnalités du Bacterial Identification

Program :

1- La Matrice d'identification

La matrice d'identification peut être affichée en sélectionnant l'onglet «Matrice». Elle peut être affichée sous forme de nombres entiers (allant de 1 à 99) représentant la probabilité en pourcentage d'obtenir un résultat positif, ou encore peuvent être affichées comme +/ V / - en fonction de la valeur numérique. La vue peut être changée en cliquant le bouton droit de la souris et en cochant ou décochant Display Matrix sur le menu déroulant. Pour afficher le nom complet pour un essai ou un taxon, il faut déplacer le curseur sur l'élément, une boîte de « pop up» affiche l'élément dans son intégralité.

2-Tri de la matrice d'identification

La matrice peut être triée par un double clic sur le nom en haut de chaque colonne. Le premier double-clic effectue un tri ascendant (des résultats négatifs en premier), deux double-clics successives effectuent des tris descendant et ascendants.

Il est tout de même intéressant de noter que la matrice d'identification en question n'est pas affectée par le tri que lorsque l'onglet «Matrice» affiche une vue de celle-ci. Pour revenir à l'ordre initial, soit on clique sur le bouton droit de la souris et on sélectionne « Revert to original», ou on sélectionne un autre onglet puis on revient à l'onglet «Matrice».

L'onglet « Results » est l'endroit où les résultats d'une souche inconnue sont inscrits.

Quatre éléments propres à l'écran sont à noter :

- La barre d'information ou barre de détails.
- La grille des résultats.
- La saisie des résultats.
- Les Boutons.

3-1- La barre d'information

Est l'endroit où une clé personnelle (codification), la source de l'isolat et les détails sur l'isolat peuvent être saisi. La clé peut être composée d'un maximum de 15 caractères.

3-2- La grille des résultats :

Les résultats peuvent être inscrits dans une grille horizontale ou sous forme de liste. Ceci est contrôlé par l'état de la case : Use List Format for Results.

3-3- La saisie des résultats :

Les résultats peuvent être saisis en utilisant le clavier ou la souris. Il ya 4 états possibles pour un résultat : Positif(+), Négatif (-), Indéterminé et enfin «non réalisé».

L'état indéterminé désigne les tests menés, dont l'interprétation est difficile et induisant un état de confusion quant au résultat. L'état indéterminé nous permet d'enregistrer que le test a été fait, au lieu d'un résultat manquant.

- **Reset** : Réinitialiser les résultats de l'isolat en cour en les rétablissant tous à l'état «manquant».Les détails demeurent inchangés.
- **New** : Efface les résultats et les détails de l'isolat en cour et les rétablissant tous à l'état «manquant».
- **Recall** : Revient sur les résultats d'un isolat antérieur à partir d'un fichier archive.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- **ALIAMO, K, OLSON, CM. & FRONGILLO, EA. (2001).** Food insufficiency and American school-aged. Children's cognitive, academic, and psychosocial development. *Pediatrics*; 108: 44-53.

- **ALLEN LH. (1997).** Pregnancy and iron deficiency: Unresolved issues. *Nut Rev*; 55 (4):91-101.

- **ANDELMAN, M. B. & SERED, B. R. (1966).** Utilization of dietary iron by term infants. *AM. J. Dis. Child.*, 11: 45-55.

- **ANONYME, In EL MIR, 2002**

- **Andrews NC (2008).** Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*. 112:219-30. [PubMed 18606887].

- **Adam Z, (1996).** Iron supplementation and Malaria, A randomized, Placebo-controlled field Trial in Rural Ethiopia, University of London, London, UK 45:325-356.

- **Andaman MB and Sered BR, (1966).** Utilization of dietary iron by term infants, 111:45-55.

- **Ahluwalia N, Sun J, Krause D, Mastro A, Handle G (2004).** Immune function is impaired in iron deficiency. *Am J Clin Nutr*; 79: 516-521.

- **Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y et al (2009).** BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet*; 41: 482-487.

- **BAGCHI K, MOHANRAM M, REDDY V. (1980).** Humoral immune response in children with iron deficiency anemia. Br Med J; 280: 1249–1251

-**BAGGS, R. B. & SANFORD, A. M. (1974).**Defect in resistance to *Salmonella Typhimurium* in iron deficient rats, J. infect. Dis., 130: 409-411.

-**Beard JL.** Iron biology in immune function muscle metabolism and neuronal function J Nutr. 2001; 131: 568S-80S. [Pub Med 11160590].

-**Becroft DMO, Dix MR and Farmer K, (1977).**Intramuscular iron-dextran and susceptibility of neonates to bacterial infections. Arch. Dis.Child.52/778-785.

-**Berger J,Dyck JL, Galan P,Aplogan A,Schnieder D,Traissac P and Hercberg S,(2000).**Effect of daily iron supplementation on iron status, cell-mediated immunity and incidence of infections.Eur.J.Clin.Nutr,54:29-35.

-**Boelaert JR, Gordeuk VR, Piette J and Weinberg GA, (1997).**Conference report: international conference on HIV and iron.Trop. Med.Int.Health 2: 1102-1106.

-**Burman D, (1972).**Hemoglobin levels in normal infants aged 3 to 24 months and the effect of iron.Arch.Dis.Child.47: 261-271.

-**Biggs TE, Baker ST, Botham MS et al.**Nramp 1 modulates iron homeostasis in vivo and in vitro: evidence for a role in cellular release involving the acidification of intracellular vesicles.Eur J Immunol.2001; 31:2060-70. [PubMed: 11449359].

- **BASTA S, SOEKIRMAN M, KARRYADI K, SCRIMSHAW N. (1979).** Iron deficiency anemia and the productivity of adult males in Indonesia. *Am. J. Clin. Nutr*; 3:916-25.

- **BAYNES RD. (1996).** Assessment of iron status. *Clin Biochem*; 29: 209-15.

- BEAMISH MR, HALES CN, ET al, (1972).** An immunoradiometric assay for Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *J. clin pathol*.

- **BELAIS. (1995).** Anémies carentielles. In: BENSENOUCI A. MAZOUNI M. Edition EPU. Elements de pédiatrie. Alger. 2: 535-549.

- **BERGER J, DYCK JL, GALAN P, APLOGAN A, SCHNEIDER D, TRAISSAC P, HERCBERG S. (2000).** Effect of daily Iron supplementation on Iron status, cell-mediated immunity, and incidence of infections in 636 month old Togolese children. *Eur J Clin Nutr*; 54:29-35.

- **BERNARD J, LEVY J. P, VARET B, CLANVEL J. P, RAIN J. D, SULTAN Y, (1981).** Hématologie, 5^{ème} Ed, MASSON.

- **BORDESSOULE D. (1992).** Carence martiale : étiologie, physiopathologie, diagnostic, principe de traitement. *Paris. Rev. Prat*; 426: 767-771.

- **BOTHWELL T. H., CHARLTON R. W., COOK J. D., FINCH C. A. (1979).** Iron Metabolism in Man Blackwell Scientific Publications Oxford, UK.

- **BRADLEY, J. & XU, X. (1996),** Diet, age, and the immune system. *Nutrition Reviews*, 54, S43-S50.

-Barry DM, Reeve AW (1977).Increased incidence of gram negative neonatal sepsis intramuscular iron administration; 60: 908-912.

-Beaumont C, Delaby C (2009) .Recycling iron in normal and pathological states. Semin Hematol; 46: 387-393.

-Bagchi K, Mohanram M, Reddy V(1980).Humoral immune response in children with iron deficiency anemia.Br Med J;59: 1249-1251.

-Beard JL (2001).Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning Nutr; 131:568S-580S.

-Bethel DR, Huang J (1999).Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea.Biomaterials; 17:337-342.

-Boelaert JR,Vandecasteele SJ,Appelberg R et al (2007).The effect of the host's iron statut on tuberculosis.J Infect Dis;195: 1745-1753.

-Barbit JL, Huang FW, Xia Y et al (2007). Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance.J Clin Invest; 117: 1933-1939.

-Berger T, Togawa A, Dancan GS et al (2006).Lipocalin 2-deficient exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not ischemia-reperfusion injury.Pro Natl Acad Sci USA;103: 1834-1839.

-Bao G, Clifton M, Hoette TM et al (2010).Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (NGAL)-catechol complex. Nat Chem Biol; 6:602-609.

-Baker M, Wilson D, Sabeti PC et al (2010).Host genetic factors involved in iron regulation may influence susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*: a pilot study. Abstract presented at the fourth Annual New England TB Symposium; July 2010

-Breuer W, Shvartsman M, Cabantchik ZI (2008).Intracellular labile iron.Int J Biochem Cell Biol; 40:350-354.

-Baron, E. J., and S. M. Finegold. (1990). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 8th ed. C.V. Mosby Company, St. Louis, MO

-CALOP J, LIMAT S, FERNANDEZC, (2008), pharmacie technique et thérapeutique, MASSON, 497P.

-Chan YR, Lius JS, Pciask DA et al (2009).Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against *Klebsiella* infection Immunol; 182: 4947-4956.

- CANONNE-HERGAUX F., GRUENHEID S., GOVONI G., GROS P. (1999), The NRAMP 1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. Proc. Assoc. Am. Physicians 111:283-289.

-Cantwell RJ, (1972).Iron deficiency anemia of infancy. Some clinical principles illustrated by the response of Maori infants to neonatal parenteral iron administration.Clin.Pediatr.II: 443-449.

- **CHANDRA, R. K. (1973).**Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency. Arch. Dis. Child., 48: 864-871.

- **CHANDRA R.K. (1991).** Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. Am J Clin Nutr. 53: 1087-101.

-Chandra RK (1977).Lymphocyte subpopulation in human malnutrition.Cytotoxic and suppressor cells. Pediatrics; 59: 423-427.

-Chandra RK, Saraya AK (1975).Impaired immunocompetence associated with iron deficiency Pediatric; 86: 899-902.

- **CHARLES JANEWAY, PAUL TRAVERS. (2001).** immunobiology, garland publishing, NEW YORK and London.

- **CHEVALIER PH. (1995).** Zinc and duration of treatment of severe malnutrition. Lancet.; 345 : 1046-7.

-CHWANG L, SOEMANTRI AG, POLLITT E. (1988). Iron supplementation and physical growth of rural Indonesian children. Am J Clin Nutr, 47: 496-501

- **COUSIN J. (1991).** La carence martiale ... toujours d'actualité chez le nourrisson. NPN. Médecine.: 177 : 381-384.

- **CUISINIER-RAYNAL J.C., DUCOWS M., LECOADOU A., DU BOURGUET F. (1985).** Le Syndrome d'Immunodéficit nutritionnel. Méd Trop; 45 : 135-43.

-**Chippaux JP, Schneider D, Aplogan A, Dyck JL and Berger J(1991).**Effet de la supplémentation en fer sur l'infection. Bull.Soc.Pathol.Exot. 84: 605-609.

-**Chwang LC, Soemantri AG, and Pollitt E (1988).**Iron supplementation and physical growth of rural Indonesian children .Am.J.Clin.Nutr.47:496-510.

-**Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Govoni G and Gros P (1999).**The NRAMP protein 1 and its role in resistance to infection and macrophage function.Pro Assc Phys. 122/ 46-55.

-**Collins HL (2003).**The role of iron in infections with intracellular bacteria.Immunol Lett; 85: 193-195.

-**Cellier MF, Courville P, Campion C (2007).**Nramp 1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense microbe's infect.9: 1662-1670.

-**Chlosta S, Fishman DS, Harrington L et al (2006).**The iron efflux protein ferroportin regulates the intracellular growth.Infec Immun.74: 3065-3067.

-Cheraly BJ (2010). Cross-talk between iron homeostasis and intestinal inflammation. Gut Microbes; 1: 65-69

-Clifton MC, Corrent C, Strong RK (2009). Siderocalin: siderophores-binding protein of the innate immune system. BioMetals; 22:557-564.

- **David M, Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David B. Roth, (2006-2007).** Immunologie de la 7^e Edition anglaise. Traduction par: Pr. Pierre L. MASSON.

- **DE MAEYER, EM. & ADIELS- TEGMAN, M. (1985).** The prevalence of anemia in the world, RAPP, Trimestre de santé mondiale, 38; 306-16. Schoolchildren in Istanbul. Journal of tropical pediatrics, 51: 346-350.

- **DE ONIS M., MONTEIRO C., AKRE J., and GLUGSTON G. (1993).** The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on child growth. Bull WHO; 71: 703-12.

- **DE SILVA, NR. (2003).** Impact of mass chemotherapy in the morbidity due to soil transmitted nematodes, Acta Trop, 86, 197-214.

- **Dr. NATHALIE ALADJIDI, (2010).** Déficits immunitaires de l'enfant en pratique clinique.

-**DUTRAC T, (2000).** S'y retrouve dans les anémies, p-p 1-9.

-Dhur A, Galan P and Herzberg S (1989).Iron statut, immune capacity and resistance to infections.94: 11-19.

-Dallman PR (1987). Iron deficiency and the immune response. Am J Clin Nutr; 46: 329-334.

-De Domenico I, Ward DM et al (2007).The molecular mechanism of hepcidin regulates-mediated ferroportin down-regulation. Mol Bio Cell; 18: 2569-2578.

-Doherty CP (2007).Host-pathogen interaction: the role of iron .J Nutr; 137: 1341-1344.

-Devireddy LR, Hart DO, Goetz DH et al (2010).A mammalian siderophores synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production. Cell ; 141: 1006-1017.

-Devireddy LR, Gazin C, Zhu X et al (2005).A cell surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake .Cell; 123: 1293-1305.

- EDGERTON, V. R. (1972). Et al. Iron deficiency anaemia and physical performance and activity of rats. J. Nutr., 102: 381-399

- FAIRWEATHER-TAIT SJ. (1992). Iron deficiency in infancy: easy to prevent - or is it? Eur J Clin Nutr, 46 (Suppl 4):S9-S 14.

- FAO - OMS -(1992). Conférence Internationale sur la Nutrition. Nutrition et développement, une évaluation d'ensemble. Rome; FAO.

-Fisbach MA, Lin H, Liu H, Liu DR et al (2006). How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron .Nat Chem Biol; 2: 132-138.

--Fisbach MA, Lin H, Zhou L et al (2006). The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. Proc Natl Acad Sci USA; 103: 16502-16507.

- FRANGILLO. E. A, HANSON JR& KMP, (1995). Determinants of variability among nations in child growth. Annals of human biology; 22 (55): 395-411.

-Figueiredo MVB, Martinez, Chaway, (2008). Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. Appl Soil Ecol 40:182-188.

-Fraillery Dominique, (2001). Mise au point d'un modèle de pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* chez la souris et utilisation à des fins d'immunoprévention passive.

-Farmer K (1976). The disadvantages of routine administration of intramuscular iron to neonates. 84: 286-287.

-Farmer K and Becroft DMO (1976). Administration of parental iron to new born infants. 51: 500-501.

-Farthing MJ (1989). Iron and immunity, Acta Paediatr, Scand, Suppl, 361: 44-52.

-Flint J, Harding R, Boyce AJ and Hercberg S (1992). The population genetics of the haemoglobinopathies. 6: 215-245.

-Forman ML and Stiehm ER (1969). Impaired opsonic activity but normal phagocytosis in low birth weight infants. *Nat*; 281: 926-931.

-Feder JN, Gnirke A, Thomas W et al (1996). A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*; 13: 399-408.

-Flo TH, Smith KD, Sato S et al (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestration of iron. *Nature*; 432: 917-921.

- GALAN P, YOON HC, PREZIOSI P, VITERI F, VALEIX P, FIEUX B, BRIANCON S, MALVY D, ROUSSEL AM, FAVIER A, HERCBERG S. (1998). Determining factors in the iron status of adult women in the SU.VI.MAX study. Supplémentation en Vitamines et Minéraux AntioXydants. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52:383-8.

-Goswami T, Andrews NC (2006). Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem*; 281: 486-490.

-Feng Xue-bin, Yang Xi-qiang, Shen Jin(1994). Influence of iron deficiency on serum IgG Sub class and pneumococcal polysaccharides specific IgG Subclass antibodies. *Chin Med*; 107: 813-816.

-Forbes JR, Gros P (2007). Divalent metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*; 9: 1662-1670.

- **GARDNER GW, EDGERTON VR, SENEWIRATNE B, BARNARD RJ, OHIRA Y. (1977).** Physical work capacity and metabolic stress in subjects with iron deficiency anemia. Am, Clin Nutr; 30:910-7.

-**Gerald TK (2003).**The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity Nutr; 114: 357-367.

-**GARCIC A. CLIN. CHEM. (1979).** Acta 94, 115-119.

-**GILBERT B, (1982).** Nutrition et santé alimentation, Ed. Delta et Spes

- **GIROT R. (1997).** Le métabolisme du fer. In; option bio: 178-5.

- **GOLDSBY, R-A, KINDT, T-J, OSBORNE, B-A, (2000).** Kuby immunology, New York, fourth edition New York. WH free man& company.

-**GOTTRAND F, SEGUR D, (1999).** Besoins nutritionnelles du nourrisson, de la femme enceinte et allaitante et de la personne âgée : énergie, fer, protéine, acides gras essentiels, vitamine D, calcium. 49p.

-**Ganz et Hepcidin, (2003).**A key regulator of iron metabolism and mediator of anemia and inflammation; Blood; 102(3); 783-788.

-**Guerinot, Meidi et Plessner, (1990).**Citrate as a siderophores in Bradyrhizobium japonicum.J.Bacteriol.172, 3298-33 03.

-Garrity, Stalley, Boone, Brenner, De Vos, Good follow et al, (2004).Bergey's manual of systematic bacteriology second edition. East Lansing, MI, US: Springer.

-Galan P, Thibault H and Preziosis P (1992).Interleukin 2 production in iron deficient children.Biol.Trace Elem.Res.32: 421-429.

-Gao J, Chen J, Kramer M et al (2009).Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferring receptor 2 required for transferring induced hepcidin expression. Cell Metab; 9: 217-227.

-Ganz T, Nemeth E (2011).Hepcidin and disorders of iron metabolism. Ann Rev Med; 62: 13-15.

-Ganz T, Nemeth E (2009). Iron sequestration and anemia of inflammation. Semin Hematol; 46: 387-393.

-Gomolion F, Gisbert JP (2009).Anemia and inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol; 15: 4659-4668.

-Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N et al (2007). The neutrophile lipocalin NGAL is abacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition.Mol Cell; 10: 1033-1043.

-Harju E (1988).Empty iron stores as a significant risk factor in abdominal surgery.J.Parent.Enter Nutr.12: 282-285.

-Harshko C (1993).Iron, infection and immune system function.Pro.Nutr.Soc.52: 165-174.

-Hugh, R. and E. Ryschenkow. (1961). *Pseudomonas maltophilia*, an Alcaligenes-like species. J. Gen.Microbiol. 26:123-132.

-Halluquist NA, McNeil LK, Lockwood JF AND Sherman AR (1992).Maternal-iron deficiency effects on peritoneal macrophage and peritoneal natural killer cell cytotoxicity.Am J Clin Nutr; 55:741-746.

-Harshko C, Peto TEA and Weatherall DJ (1988).Iron and infection.Br.Med.J.296: 660-664.

- HALLBERG L., ASPN. (1996). Iron nutrition in health and disease. John Libbeyed., London, 364 p.

- HALL A, BOBROW E, POROOKER S, JUKES M & NOKESK. (2001). Anemia in schoolchildren in eight countries in Africa & Asia. Public health Nutr, 4, 749-756.

- HALL A, ROSCHNIK N, OUATTARA F, TOURÉ I, SOCKO M, MOESTUE H& BENDECH M A., (2002). A randomized trail in Mali of the effectiveness of weekly iron supplements given by teachers on the heamoglobin concentration of schoolchildren. Public health Nutrition,, 5 (3), 413-418.

- **HALLQUIST NA, MCNEIL LK, LOCKWOOD JF, SHERMAN AR. (1992).** Maternal-iron-deficiency effects on peritoneal macrophage and peritoneal natural-killer-cell cytotoxicity in rat pups. Am J Clin Nutr, 55: 741–746.

- HAMLADJI R. M, NACER A. R, (1993).** Les anémies, ed palais du livre.

- **HARIF M. (2000).** Les anémies hémolytiques congénitales. Espérance médicale, tome 7 N° 59.

- **HARMATTAN, (1994).** Immunité de l'humanité

- **HERBERG S. (1989).** Aspects actuels des carences en fer. Le concours Medical : 111 (38) : 3410-3412.

- **HIGASHI, O. et al. (1967).** Mean cellular peroxidase (MCP) of leucocytes in iron deficiency anaemia, Tohoku. J. exp. Med., 93: 105-113.

- **HIGGS, J. M. & wells, R. S. (1972).** Chronic muco-cutaneous Candidiasis: associated abnormalities of iron metabolism. Br. J. Dermatol., 86 (supp. 18): 88-102.

- **HURRELL, R. F. (1997).** Bioavailability of iron. European journal of clinical nutrition, 51, S4-S8.

- Haas, Eisendle et Turgeon, (2008).**Siderophores in fungal physiology and virulence; Annual Review of Physiopathology; 46: 149187.

-Hannauer Melissa, (2001). Etudes du mécanisme moléculaire impliqué dans l'acquisition du fer par la pyoverdine et le ferrichrome de *Pseudomonas aeruginosa*, Thèse de doctorat, Université de Strasbourg.

-Hayek, DOEBBELING ET FICK (1993). Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa* infected lungs of patients with cystic fibrosis; *Infection and Immunity*; 61(12); 5049-5055.

-HAYEN et VOLMER (2006). Rapid identification of siderophores by combined thin-layer chromatography/ matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry; *Rapid communication in Mass Spectrometry*; 19(5); 711-728

-Howard, -Rafle, Tiwari et Faull, (200). Hydromate siderophores of *Histoplasma capsulatum*; *infection and immunity*; 68(4); 2338-2343.

-Higgs JM, Well RS (1972). Chronic mucocutaneous candidiasis associated abnormalities of iron metabolism. *Br J Dermatol*; 86-89.

-Homes MA, Paulsene W, Jide X et al (2005). Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins potentially defending against mycobacterial infection through iron sequestration. *Structure*; 13: 29-41.

- IRD., (1996). LepNUT, Epidemiology in action, surveillance Nutritionnelle, Module d'apprentissage, Liverpool/Epidemiology program, Version Français 1.0, laboratoire de nutrition Tropical, IRD, Montpellier.

- **JANEWAY, C., CHARLES, A., TRAVERS, P, WALPORT, M., SHLOMCHIK, M., (2001).** Immunobiology 5: the immune system in health and disease, New York & London, garland publishing, 5th, Ed.

- **JAMBON (B. :), MONTAGNE (P.), BENE (M.C.), BRAYER (M.P.), FAURE (G.), DUHEILLE (J.), (1981).** « Immunohistologic localization of facteur thymique sérique (F.T.S.) in human thymie epithelium », J. Immunol. 127,205X.

- **JEREMY BERG, JOHN TYMOCZKO, LUBERT STRYER, (2002).** *BIOCHEMISTRY*, W.H. FREEMAN AND COMPANY, NEW YORK.

- **JOYNSON, D. H. M. et al. (1972).** Defect of cell- mediated immunity in patients with iron- deficiency anaemia. Lancet, 2: 1058-1059.

- **Jagadeesh, Kalkarni et Krishnarhnraraji,(2008).** Evaluation of the role of fluorescent siderophores in the biological control of bacterial wilt in tomato using TN5 mutant of fluorescent *Pseudomonas* Sp. Current science, 882.

- **JONSON (2008).** Iron and Siderophores in fungal host interactions; Mycology Research; 122(Pt); 170-183.

- **Javaid N, Haschke F, Pietsching B, Shuster E,Huemer C,Shebaz A, Ganech P,Steffen I,Hurrel R and Secretin MC (1991).** Interactions between infections, malnutrition and iron nutritional status in Pakistan infants. Acta Pediatric. Scand Suppl.80: 141-150.

- **Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Jensen RJ, Gunter E et al (2001).** The effect of iron deficiency on lymphocyte cytokine production and activation: preservation of hepatic iron but not at all cost. Clin Exper Immunol; 126: 466-473.

-Joynson DHM, Jacobs A, Walker M, Dolby AE (1972). Defect of cell-mediated immunity in patients with iron deficiency anemia. Lancet; 2: 1058-1059.

-Johnson EE, Sandrgen A, Cherayil BJ et al (2008).Role of ferroptin in macrophages-mediated immunity. Infect Immun; 78: 5099-6011.

-Johnson EE, Srikanth CV, Sandgren A et al (2010). Siderocalin inhibits the intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol; 58: 138-145.

-Karlidag,Estiken,Turan et Sahin F, (2007).Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple.Sci Hort 114(1):16-20.

-Korchan I (1973).The role of iron in bacterial infections with special consideration of host-tubercle bacillus interaction.Curr.Top.Microbiol.Immunol.60: 1-30.

-Kendall, Hochella et Becker, (2005).Computational modeling of azotabactin-goethite/diaspore interaction: application of molecular force measurements and siderophores-mineral reactivity; Chemical Geology; 216(1-2); 17-35.

-King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanine and fluorescent. J. Lab. & Clin. Med. 44(2): 301-307

-Klepper, Schippers et Bakker, (1992).Proposed elimination of the term endorhizosphere, Phytopathol.82: 726-727.

-Kosman, (2003).Molecular mechanism of iron uptake in fungi; Molecular Microbiology; 47(5); 1185-1197.

- **KATONA-APTE. MOKHDA A., (1998).** Malnutrition of children in the democratic people's associated mortality in US children (1968). *Throught 1991. JMA*, 274 (14), 1143-1148

-**Kovacs, N. (1956).** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*; 178:703.

. **KEUSCH CT, URRUTIA II, FERNANDEZ R, GUERRERO O, CASTENADA G. (1977).** Humoral and cellular aspects of intracellular bacterial killing in Guatemala children with protein-caloric malnutrition. In: Suskind RM, ed. *Malnutrition and the immune response*. New York: Raven Press, 245-51.

- **KLEBANOFF, S. J. (1971).**Intraleukocytic microbicidal defects. *Annu. Rev. Med.*, 22: 39-62.

- **KOCHANOWSKI BA, SHERMAN AR. (1984).** Phagocytes and lysozyme activity in granulocytes from iron deficient rat pups. *Nutr Res*, 4: 511–520.

- **KOUBAA CH., JARRAYA S.; ZOUARI S., KAABACHI., MICHRI., FATTOUM S., MBAZAA R., MHENNI H., HAMZA B. (1993).** L'Anémie carentielle parmi les enfants de 6 à 35mois dans la région de Mellasine (Tunisie). *Revue Magrèbine de pédiatrie*. III, 6: 307-312.

- **KUVIBIDILA SR, KITCHENS D, BALIGA BS. (1999).** In vivo and in vitro iron deficiency reduces protein kinase C activity and translocation in murine splenic and purified T cells. *J Cell Biochem*, 74: 468–478.

-**Kramer JL, Baltathakis I, Alcantra OS, Boldt DH (2002).** Differentiation of functional dendritic cells and macrophages from human peripheral blood monocyte precursors in dependent on expression of p21 (WAF/CIP1) and requires iron0Br *J Haematol*; 117: 727-734.

-**Krantman HJ, Young SR and Ank MJ (1982).**Immune response in pure iron deficiency. *Am J Dis Child*; 136:840-844.

-Kuvibidila SR, Kitchens D, Baliga BS (1999). In vivo and in vitro iron deficiency reduces protein Kinase C activity and translocation in murine splenic and purified Tcells .J Cell Biochem; 74: 468-478.

-Kochanowski BA, Sherman AR (1984).Phagocytose and lysozyme activity in granulocytes from iron deficiency.Nutr Res; 4: 511-520.

-Kulapongs P, Suskind R, Vithayasi V, Olson RE (1974).Cell-mediated immunity and phagocytosis and killing function in children with severe iron deficiency anemia. Lancet; 11: 680-691.

-Kaplan J (2002).Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire.Cell; 11: 603-606.

-Kell KB (2010).Towards a unifying systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prion's, bactericides, chemical toxicology and others as examples. Arch Toxicol; 84:825-850.

-Kell KB (2009).Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular, other progressive inflammatory, degenerative diseases.BMC Med Geonomics; 2:2.

-Kiska, D.L., and P.H. Gilligan.(2003). *Pseudomonas*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- LEJEUNE C, SEBAHOUN G. (1998). Anémie par carence martiale. In : Sébahoun G. Hématologie clinique et biologique. Arnette, Paris: 49-52.

- LIU, Y., GONG, LI, D., FENG, Z., ZHAO, L., DONG, T. (2003), Effects of Fish oil on lymphocyte proliferation, cytokine Production and intracellular signaling in weanling. Pigs. Arch Tierernahr. Vol. 57 (3), p.151-165.

-Ludwiczek S, Aigner E,Thurl I, Weiss G (2003).Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells blood; 101: 4148-4154.

- LOZOFF B, BRITTENHAM GM, VITERI F, WOLF AW, URRUTIA JJ. (1982). Developmental deficits in iron deficient infants: effects of age and severity of iron lack. J. Pediatr.101 (6):948-51

- LUKE A. J. O'NEILL. January 2005. "Immunity's Early-Warning System", Scientific American 292(1):38-45.

-Lamont, Anna Konings et David Reid, (2009). Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis; BioMetals

;

-Leifson, E. (1951). Staining, shape and arrangement of bacterial flagella. J. Bacteriol. 62:377-389

-Leifson, E. (1958). Identification of *Pseudomonas*,*Alcaligenes* and related bacteria. Zentr. Bakteriол.Parasitenk. Abt. I. (Orig.) 173:487-488.

-Leifson, E. (1966). Bacterial taxonomy: a critique.Bacteriol. Rev. 30:257-266.

-Lazuunski, (1998). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* et leur regulation. Méd Mal Infect.; 28 : 109-118.

-Lebuhn, Heulin et Hartmann, (1997). Production of auxine and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus* poly-strains isolated from different proximity to plant roots. FEMS Microbiology Ecology; 22: 325-334.

-Lynch, (1990). Microbial metabolites in the rhizosphere. Eds. I.M. Lynch, pp.177-206. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology.

-Liu, P. V. (1966). Differentiation of pathogenic *pseudomonads* by heat resistance of alkaline phosphatase. Am. J. Clin. Pathol. 45:639-642.

-Landro L, Damas JK, Flo TH et al (2008). Decreased serum lipocalin 2 levels in human immunodeficiency virus-infected patients: increased during highly active anti-retroviral therapy. Clin Exp Immunol; 152: 57-63.

-Lurachi A, Borgotti P, Gioria A, Fedeli P (1991). Determination of lymphocyte subpopulation defined with monoclonal antibodies in patients with iron deficiency. Minerva Med; 82: 563-567.

-Manwar , Khanewal et Chadhari, (2003). Siderophores production by marine isolate 243 applied by chemistry and biotechnology, 243-251.

-Meyer et Abdellah, (1978). The fluorescent pigments of *Pseudomonas fluorescent*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties. Journal of general microbiology. 319-328.

-Mossialos et Amoutzias, (2005).Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends; International Journal of Medical Microbiology; 299; 87-98.

- **MACKAY, H. M. (1931).** Nutritional anemia with special reference to iron deficiency. Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser., 157.

-MASSEN Z, S. BIB, C. EL MEZOUAR, Z. ARABI, S. CHEFAII. (2010).Etablissement hospitalier spécialisé, TLEMCEM, Algérie. Prévalence de la malnutrition protéino-calorique (MPC) chez les enfants algériens. Archives de pédiatrie, page 77.

- **MASSEY AC. (1992).** Microcytic anaemia. Med clin NAM: 72; 631-47.

- **MELCHIOR, J. C., (1998).** La situation des enfants dans le monde, Genève., ATAR S. A, UNICEF.

- **MILLER (D.S.), (1979).** « Prevalence of Nutritional problems in the world ». Proc. Nutr. Soc., 38,197~205.

-Miller ME (1969).Phagocytosis in the new born infants: humoral and cellular factors.J.Pediatric.74: 255-259.

-Murray MJ, Murray AB, Murray MB, Murray CJ (1978).The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections.Br.Med.J.113-115.

- **MUÑOZ C., SCHLESINGER L., CAVAJLLON J.M. (1995).** Interaction between cytokines, nutrition and infection. Nutr Res; 15: 1815-44.

-MacKay HM (1982).Anemia in infancy; its prevalence and prevention.Arch.Dis.Child.3: 117-124.

-Moore LL, Humbert JR (1984).Neutrophils bactericidal dysfunction towards oxidant-radical sensitive microorganisms during experimental iron deficiency. *Pediatr Res*; 18: 684-689.

-Meynar D, Kautz L, Darnaud V et al (2009).Lack of BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*; 41: 478-481.

-Muckenthaler MU, Galey B, Hentz MW (2008).Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein. *Ann Rev Nutr*; 28:197-213.

-Moller M, Hoal EG (2010).Current findings, challenges and novel approaches to human genetic susceptibility to tuberculosis.90: 71-83.

-Moore, H. B., and M. J. Pickett. (1960). The *Pseudomonas*-Achromobacter group. *Can. J. Microbiol.* 6:35-42.

-Miethke M, Marahiel MA (2007). Siderophores-based iron acquisition and pathogen control. *Micobiol Mol Biol Rev*; 71: 413-451.

-Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA et al (2007). Neutrophils-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest*; 117: 1988-1994.

-MacFaddin, J.F. (1985). Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria. Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London

-Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). (2003). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- NAJEAN Y. (1995). Métabolisme du fer. In : Encycl. Med chir endocrinologie Nutrition, Paris, France, 10 ; 359 : 9.

- NALDER, B. V. et al. (1972).Sensitivity of the immunological response to the nutritional status of rats. J. Nutr., 102: 535-541.

- NEIL CAMPBELL, JANE REECE, (1995). BIOLOGIE, DE BOECK.

-Neilands, (1984).Methodology of siderophores; Structure and Bonding; 58; 1-24.

-Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J et al (2004).Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science; 306: 2090-2093.

-Nairz M, Theurl I, Ludwiczek S et al (2007).The co-ordinated regulation of iron homeostasis in murine macrophages limits the availability of iron for intracellular. Cell Microbiol; 9: 2126-2140.

-Nairz M, Fritsche G, Brunner P et al (2008).Interferon limits the availability of iron for intra macrophage. Eur J Immun; 38: 193-203-16-936.

- **Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (1992).** Les anémies Nutritionnelles, série de rapports techniques, N°53. Genève. 6 : plo-kouif.

- **OMS., (1995).** Rapport d'un comité OMS d'experts, Utilisation et interprétation de l'anthropométrie, Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 1995, n°85, 498pages.

- **OMS/UNICEF. (2004).** Joint statement: focusing on anemia towards an integrated approach for effective anaemia control, (OMS).

- **OSKI, F. A. (1993).** Iron deficiency in infancy and childhood. N. Engl. J. Med. 329, 190-193.

- Oppeinheimer SJ (2001).**Iron and its relation to immunity and infection disease Nutr; 131: 6168-6355.

- Olakanmi O, Schneider LS, Britigan BE (2007).**Hereditary hemochromatosis results in decreased iron acquisition and growth by Mycobacterium tuberculosis within human macrophages' Leukoc Biol; 81: 195-204.

- **PADDLE, J. J (2002).** Evaluation of the haemoglobin color scale and comparison with the haemoglobin assay, Bull organ Mond santé, 80, 813-816.

- **PARIS M, RYMER JC, DEZIER JF. (1991).** Métabolisme du fer : exploration biologique actuelle. *Concours médical*; 113 : 29-34.

-PASULT L, (2002). Du fer pour la santé, Canada, mai.

-PELLETIER, J. P. (1993). L'enfance en milieu tropical, les malnutritions sévères : approche global, centre national de l'enfance, Paris n°208-209

- PELLETIER D.L. (1994). the potentiating effects of malnutrition on child mortality: epidemiologic evidence and policy implications. *Nutr Rev*; 52: 409-15.

- PRADELIZI (D.), HAREGBELLAN (A.), CHATBNOUD (L.), (1984). « Le rôle des interleukines dans l'auto-immunité (Editorial) », *La Presse Médicale*, 13, 713.

-Palleroni, Kunisawa, Conpoulou et Doodoroff, (1973).Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Sys Bacteriol* 23:333-339.

-Paradkar PN,De Dominico I,Durchfort N et al (2008).Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages. *Blood*; 112: 866-874.

-Peyssonaux C,Zinkernagel AS,Datta Vet al (2006).TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*; 107: 3727-3732.

-Pietrangelo A (2010).Heredity hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis and treatment *Gastroenterology*; 139: 393408.

-Philpott C (2010).Bioinorganic chemistry: getting a grip in iron. *Nat Chem Biol*; 6:568-570.

- **RADIMER H. L. OLSON C. M., GREENE. J. C., CAMPBELL C. C. & HABICHT J. P. (1992).** Understanding Hunger & developing indicators to asses it in women & children, J. nutr. Educ, 24: 36S-44S.

- **REINHERZ EL, SCHLOSSMAN SF. (1981).** The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. Immunol Today; 2:69-74.

-**Rabka, Henry, Caris, Morel, Padeloup, Baret, J-L Pierre, Brissot, Lescoat et Crichton, (1998).**Biochem. Pharmacol. 55, 1797.

-**Raffatellu M, George MD, Akiyama Y et al (2009).** Lipocalin 2-dependent resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Thyphimurium for growth and survival in the inflamed intestine. Cell Host Microbe; 5: 476-486.

-**Richardson DR (2005).**Dawn of a new iron age. Cell; 123:1175-1177.

-**Redfearn, M. S., N. J. Palleroni, and R. Y.Stanier. (1966).** A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. J.Gen. Microbiol. 43:293-313.

- **SANCHEZ –MEDAL, L. (1969).** Iron deficiency in pregnancy and infancy, In: Iron metabolism and anaemia; Washington, Pan American Health organization, (scientific publication NO. 184), p. 65.

-**Siddiqui et Akhtar, (2008).**Biocin.Sci.Technol. 18 : 279-290.

-**Stanier, Palleroni, Doodoroff, (1966).**The aerobic *Pseudomonads*: A taxonomic study.J Gen Microbiol 43: 159-271.

-Sharman, Williams, Ewing et Rutledge, (1995).Determination of the structure of exochelin MN, the extracellular siderophores from *Mycobacterium neoaurum*; Chemistry and Biology; 2(8);553-561.

-Sherris, J. C., J. G. Shoesmith, M. T. Parker, and D. Brackon. (1959). Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria. Their use in the identification of *pseudomonads*. J. Gen. Microbiol.21:389-396.

- **SCHLESINGER L, STEKEL A. (1974).** Impaired cellular immunity in marasmic infants. Am J Clin Nutr, 27: 615-20.

-Society of American Bacteriologists, Committee on Bacteriological Technic. (1957). Manual of Microbiological Methods. Mc Graw-Hill Book Co., Inc., New York.

-Soe-Lin S,Sheiftel AD,Wasyluk et al (2009).Nramp 1 promotes efficient macrophage recycling.Exp Hematol; 36: 929-937.

- **Soe-Lin S, Apte SS, Andriopoulos B Jr et al (2009).**Nramp 1 equips macrophages recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo.Proc Acad Sci USA.106: 5960-5965.

- **SCRIMSHAW N.S., TAYLOR C.E., GORDON J.E. (1971).** Interactions entre Mat nutritionnel et les infections. Genève; OMS, 11'57.

- **SEBAHOUN G. (1998).** Anémies : caractérisation, mécanismes, orientation diagnostique. *In* : Sébahoun G. *Hématologie clinique et biologique*. Arnette, Paris : 45-8.

- **SPEAR AT, SHERMAN AR. (1992).** Iron deficiency alters DMB Induced tumor burden and natural killer cell cytotoxicity rats. J. Nutr; 122: 46–55.

-**Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doodoroff. (1966).** The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43:159-271.

-**Salmi T, Hanninen P and Peltonen T (1962).**Applicability of chelated iron in the care of prematures.Acta Pediatr.Scand.Suppl.114-124.

-**Scrimshaw NS and San Giovanni JP (1997).** Synergism of nutrition, infection and immunity: an overview.Am.J.Clin.Nutr.66: 464S-477S.

-**SULTAN C, GAOULT-HELMANN M, (1994).** Aide mémoire d'hématologie, FLAMMARION DELAVIGNE, Paris.

-**Spear AT; Sherman AR (1999).**Iron deficiency alters DMBA-induced tumor burden and natural killer in resistance to infection and macrophage function.Proc Assc Am Phys. 111/ 283-289.

-**Santos PC, Falco RP (1990).**Decreased lymphocyte subsets and K-cell activity in iron deficiency. Acta Haematol; 84: 118-121.

Sutter, V. L., V. Hurst, and A. O. J. Landucci.(1966). *Pseudomonads* in human saliva. J. Dental-Res. 45:1800-1803.

-**Sipahi T, Akar N, Egin Y, Clin S (2003).**Serum interleukin-2 and interleukin-6 levels in iron deficiency anemia. Pediatr Hematol Oncol; 15: 169-173.

-Schmidt PJ, Toran PT, Gianneti AM et al (2008).The transferrin receptor modulates *HFE*-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*; 7:205-214.

-Schaible UE, Kaufmann SH (2004).Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol*; 2: 946-953.

-Stein J, Hartman F, Dignass AU (2010).Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD.*Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 7: 599-610.

-Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A et al (2006). Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis*; 12: 1101-1106.

-Saiga H, Nishimura J, Kuwata H et al (2007). Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium *Immunol*; 181: 8521-8527.

-Sutter, V. L., V. Hurst, and C. W. Lane. 1967. Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* in feces of Healthy Human Adults. *Health Lab. Sci.* 4:245-249.

- **THOMAS, D. & FRANKENBERG, E. (2002).** Health, Nutrition and prosperity: a microeconomic perspective. *Bulletin of the world health organization*, 8, 106-113.

- **THOMAS C., THOMAS L., (2002).** Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency, *Clin. Chem.*, 48, 1066-1076.

- **TOMKINS A., WATSON F. (1989).**Malnutrition and Infection: a review. Geneva; WHO, ACC/SCN.

-Tielsh JM, Khatry S,Stoitzfus RJ et al(2006).Effect of routine prophylactic supplementation with iron and folic on preschool child mortality in southern Nepal; 367: 144-152.

-Thomson, R.B., and J.M. Miller. (2003). Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-VITERI F. (1997). Prevention of iron deficiency. In: Institute of Medicine NASE, editor. Prevention of micronutrient deficiencies. In "Board of international health, food and nutrition". Tools for policy makers and public health workers. Washington; 45-103.

-VERNET-NYSSEN M. (1983). Détermination du fer sérique par la méthode sélectionnée par la Société française de biologie clinique : étude des modalités de déprotéinisation. *Ann Biol Clin* (1983) ; 41 : 445-52.

- VERNET-NYSSEN M, BEAUMONT C, DELLAMONICA C, et al. (1981). Fer sérique, capacité de fixation du fer par le sérum, saturation de la transferrine : données récentes, proposition de terminologie. *Ann Biol Clin* ; 39: 301-7.

-Van Heerden C,Oosthuizen R,Van Wyk H, Prinsloo P,Anderson R(1981). Evaluation of Neutrophils and lymphocyte function in subjects with iron deficiency anemia.59: 111-113.

-Von Graevenitz, A. (1965). Über die Isolierung von *Pseudomonas maltophilia* aus klinischem Untersuchungsmaterial. *Med. Welt* 3:177-178.-

-Von Graevenitz, A. (1965). *Pseudomonas stutzeri* isolated from clinical specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 43:357-360.

-WAJCMAN H, LANTEZ B, GIROT R, (1992). Les maladies des globules rouges, ed INSERM.

-Weinberg ED,(2009).Iron availability and infection.Biochim Biophys ; 1790 : 1790 :600-605.

-Weiss G (2002). Iron, infection and anemia- a classical triad.Wein Klin Wochenscher; 133: 336S-340S.

-Walter T,Arrendo S,Arevalo M,Stekel A(1986).Effect of iron therapy on phagocytosis and bactericidal activity in Neutrophils of iron deficiency infants .Am Clin Nutr;44: 877-882.

-Wang L, Cherayil BJ (2001).Ironing out the wrinkles in host defense: interaction between iron homeostasis and innate immunity Innate Immun; 9: 397-341.

-Wang L,Johnson EE,Shi HN et al (2008).Attenuated inflammatory responses reveal a role for iron in the regulation of macrophage cytokine translation Immunol;181: 2726-2731.

-Wessling-Resnick M (2010). Iron sequestration and the inflammatory response.Annu Rev Nutr; 30: 105-122.

-Wahba, A. H., and J. H. Darrell. (1965). The identification of atypical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 38:329-342.

-Yetgin S, Altay C, Ciliv G, Laleli Y (1979).Myeloperoxidase activity and bactericidal function of PMN in iron deficiency. Acta Haematol; 61:10-17.

-Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C et al (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. Nat Chem Biol ; 4 : 33-41.; 10: 1045-1056.

-Yang J, Goetz D, Li JY et al (2002).An iron delivery pathway mediated by lipocalin .Mio Cell

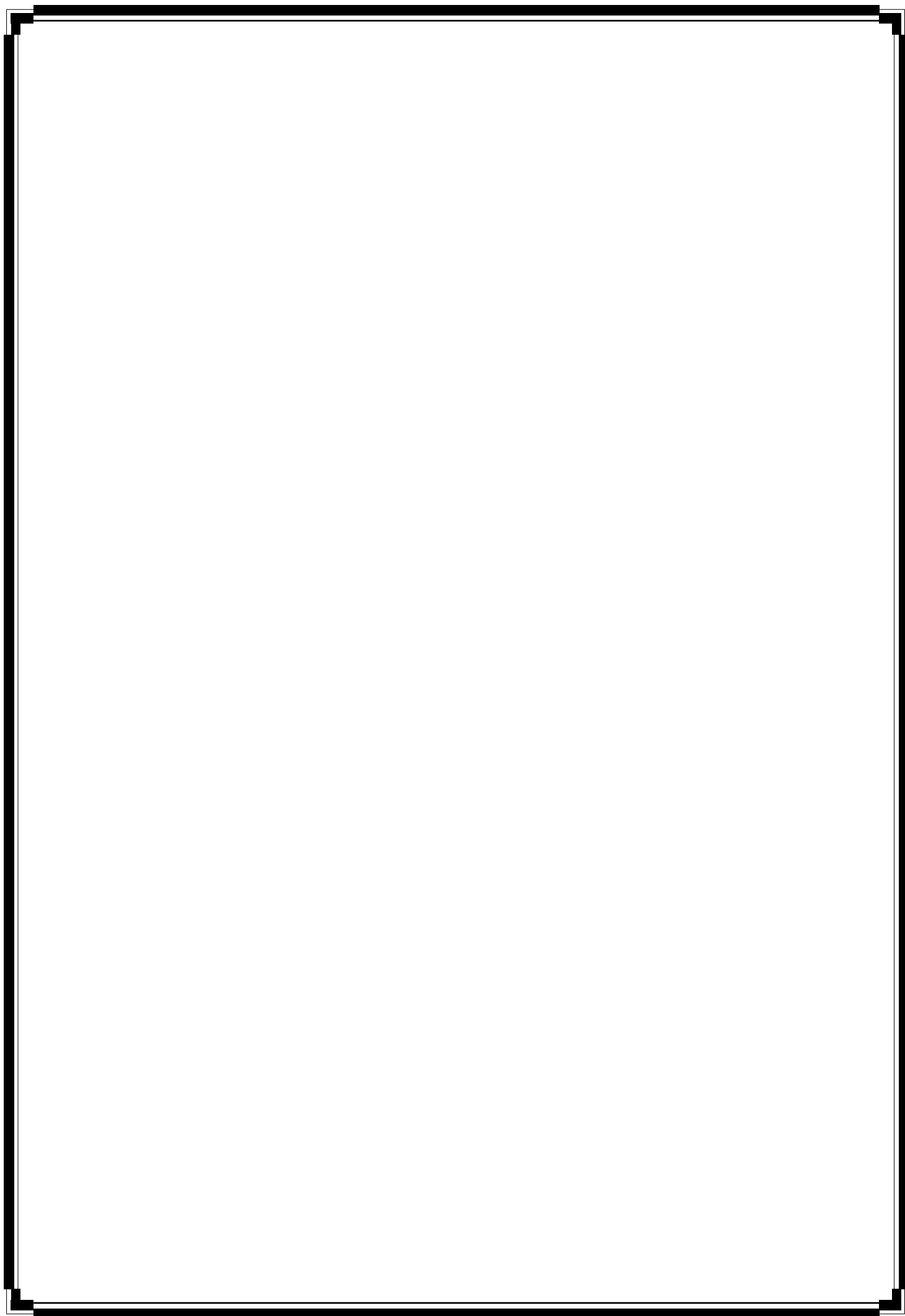
-ZITOUNI R, BERNARD A, SAMANAH, (1982). Manuel d'hématologie, ed SOIN.

L'adresse sur Net:

Www.wikipedia.Org/ **Association** **d'anémie** **falciforme** **du** **Québec**
Www.anemie-falciforme.Org

LES

ARTICLES



Iron Deficiency Anemia in Children and Alteration of the Immune System

Soraya Rahmani and Abbassia Demmouche*

Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life-djillali University sidi bel abbès-liabes, Algeria

Abstract

Background and objectives: While there is evidence of an altered immune profile in iron deficiency, the precise immunoregulatory role of iron is not known. Information particularly in children who are vulnerable to iron deficiency and infection, is lacking. We aimed to study the effect of iron deficiency anemia (IDA) on immunity.

Methods: In 101 children with IDA (iron deficiency anemia), (study group), and 99 normal children (control group), the percentage of lymphocytes, monocyte, neutrophile, level of immunoglobulin and serum iron, ferritin, Hb, MCV, HT, MCHC, MCH were compared.

Results: There was a significant difference between the two groups (control and study) in the distribution of various hematological and biochemical parameters (serum iron, ferritin, Hb, MCV, Ht, MCHC, MCH), ($P < 0.05$).

The percentage of monocyte levels was $5,529 \pm 3,720$ in children with IDA and $4,574 \pm 2,910$ in the control group ($p = 0.044$). The percentage of neutrophils was $45,045 \pm 15,982\%$ in children with IDA and $57,562 \pm 16,267\%$ in the control group ($p < 0.0001$). The percentage of lymphocytes with was $43,681 \pm 17,936\%$ in children with IDA and $38,199 \pm 16,699\%$ in the control group ($P < 0.026$). There was no difference in the distribution of eosinophile and basophile ($p > 0.05$). The percentage of EOSINOPHILE was $0.881 \pm 1,385\%$ in the anemic group; and $0.877 \pm 0.938\%$ in the control group ($P = 0.979$). The level of BASOPHILE was $0.307 \pm 0.522\%$ in the anemic group; and $0.387 \pm 0.603\%$ in the control group ($P = 0.318$). IgG level was $548,772 \pm 91,885$ mg/dl in children with IDA and $852,714 \pm 181,424$ mg/dl in normal children ($P < 0.0001$). IgA level was $74,123 \pm 35,109$ mg/dl in study group, and in $94,936 \pm 64,452$ mg/dl control group ($P < 0.0049$). IgD level was $4,729 \pm 6,53$ mg/dl in anemic group and in control group was $7,191 \pm 6,439$ mg/dl ($P < 0.0081$).

Conclusion: These results suggest that humoral, cell-mediated which have an important role in various steps of immunogenic mechanisms are influenced by iron deficiency anemia.

Keywords: Iron deficiency; Anemia; Immune functions; Neutrophil; Monocyte

Introduction

Protein-calorie malnutrition (PCM) is associated with a significant impairment of cell mediated immunity, phagocyte function; complement system, secretory immunoglobulin concentrations, cytokine production and an altered immune response [1]. Deficiency of various essential vitamins and minerals such as iron, zinc, selenium, copper, vitamins A, C, E and pyridoxine, and folic acid individually have been shown to have important influences on immune responses and risk of infection. Iron deficiency is associated with impairment of cell mediated immunity and the bactericidal activity of neutrophils, thereby increasing the susceptibility to infections [2,3]. Iron deficiency might play an important role in defense mechanism and thus, the term “nutritional immunity” was coined to highlight the importance of iron deficiency to prevent bacterial growth.

Iron is also required for monocyte/macrophage differentiation and macrophages require iron as a cofactor for the execution of important antimicrobial effectors' mechanisms, including the NADPH-dependent oxidative burst. [4,5].

We aimed to make a prospective study to study the effect of iron deficiency anemia on humoral and cellular immunity.

Patients and Methods

The study was conducted in the departments of pathology and paediatrics of University hospital center and the service of Immunology; Oran (west of Algeria) during the period February - May 2014 and the sample consisted of 200 children.

All children received in the Department during the study period and our exclusion criteria were previous iron replacement therapy, any recent illness or chronic disease. A total of 101 children (12 months and 5 years) were diagnosed to have iron deficiency anemia (hemoglobin levels below 11 g/dl, regardless of sex; mean corpuscular volume (MCV) less than 80 femtoliters (fL); mean corpuscular hemoglobin (MCH) less than 27 picograms (pg); iron serum less than 58 μ g 100 ml, serum ferritin less than 07 μ g/l).

The complete blood count (automatic cell analyzer 600), serum iron (spectrophotometry) and ferritin (RIA) were measured. A measure of 1 ml of blood sample with EDTA-containing tubes was taken by venipuncture from each patient for complete blood count including differential cell counts, hemoglobin, hematocrit, serum IgG, IgM, IgA, and ferritin levels, whole blood samples were collected. Serum immunoglobulins were measured by using commercially prepared antisera to IgG, IgA, IgM. and radial immune diffusion method.

For statistical analysis, data were analyzed by the Statview software

***Corresponding author:** Abbassia demmouche, Phd in Biology at the University Djillali liabes, Algeria, Tel: +213 554 586 382; E-mail: demmoucheabbassia@yahoo.fr

Received November 13, 2014; **Accepted** November 25, 2014; **Published** November 27, 2014

Citation: Rahmani S, Demmouche A (2014) Iron Deficiency Anemia in Children and Alteration of the Immune System. J Nutr Food Sci 4: 333. doi:[10.4172/2155-9600.1000333](https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000333)

Copyright: © 2014 Rahmani S, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

(1997). Frequencies and the percentages were calculated and Student's t test was performed to investigate the significance in the association of the iron deficiency anemia and immune system. Correlations were considered significant if the observed significance level p was <0.05 . Chisquare test was used as test of significance at 5% level. Pearson's correlation coefficient was used to study the relation between immunoglobulin and iron status.

Results

A total of 101 children were diagnosed to have iron deficiency anemia (study group) which was related to nutritional deficiency. The control group consisted of 99 healthy children at the same ages (control group).

The mean age of anemic patients is (23.3 ± 16.6) months and the control group is (24.09 ± 16.6) months, ($p=0.75$). In relation to anthropometric characteristics (age and sex), no significant difference was found between two group (study and control), ($p>0.05$).

The severity of the anemia has been classified in three following phases: • severe anemia defined by a rate of Hb < 7 g/dl • moderate anemia sets a rate of $7 < \text{Hb} < 10$ g/dl • mild anemia corresponds has a rate $10 < \text{Hb} < 11$ g/dl. According to the severity, it was noted as 21.78% of patients have severe anemia, 63.36% of patients with moderate anemia and 14.85% of patients with mild anemia (Figure 1).

Biochemical and hematologic parameters measured in our study population are reported in Table 1. There was a statistically significant difference between all hematologic parameters in the two groups (study and control), ($p<0.0001$). Our study noted that, the numbers of white blood cells were significantly lower in the iron deficient group (study group), $(9.66 \pm 4.75 \times 10^{12}/\text{l})$. In the control group the numbers were $(11.19 \pm 4.33 \times 10^{12}/\text{l})$, ($p<0.04$).

Result of cellular immunity was summarized in Table 2. Mean serum neutrophil levels of the study group were $45.04 \pm 15.98\%$; the control group had mean serum levels of $57.56 \pm 16.26\%$. A statistically significant difference was detected between two groups ($p<0.0001$). There was statistically significant difference in monocytes and lymphocyte distribution between two groups ($p<0.044$, $p<0.026$ respectively).

There was no statistically significant difference in basophils and eosinophils levels between two groups (study and control), ($p>0.05$).

Table 3 shows results of humoral immunity. There was statistically significant difference in IgG, IgD, IgA levels of both groups (study and control), ($p<0.0001$, $p<0.008$, $p<0.0049$ respectively).

The study group had serum IgE levels with a mean of 0.223 ± 0.270 mg/100 ml, while the control group had a mean IgE level of 0.294 ± 0.314 mg/100 ml ($p > 0.05$).

Mean serum IgM levels of the study group were $73,343 \pm 31,013$ mg/100 ml; the control group had mean serum levels of $76,911 \pm 32,700$ mg/100 ml. No statistically significant difference was detected between two groups ($p>0.05$), (Table 3).

In our study, a correlation has been noted between iron status parameters (serum iron, ferritin, Hb, MCV, MCH, MCHC, Ht) and IgG ($r=0.63$, $r=0.48$, $r=0.68$, $r=0.43$, $r=0.44$, $r=0.30$, $r=0.62$ respectively), (Figures 2-5).

A linear correlation was found between the level of Hb and Ht ($r=0.88$); between Hb and serum iron ($r=0.85$), between Hb and MCV ($r=0.62$), between Hb and MCH ($r=0.62$), between Hb and MCHC

($r=0.57$), between Hb and ferritin ($r=0.74$). Also a correlation was detected between IgA and IgG ($r=0.26$).

A negative correlation was noted between lymphocytes and neutrophils ($r=-0.35$). But no correlation was found between lymphocytes and hemoglobin ($r=-0.18$).

Discussion

Iron deficiency is the most common micronutrient deficiency in the world. Children, particularly infants living in developing countries are highly vulnerable to infectious diseases. Therefore, understanding the relationship between iron deficiency and alteration of immune system

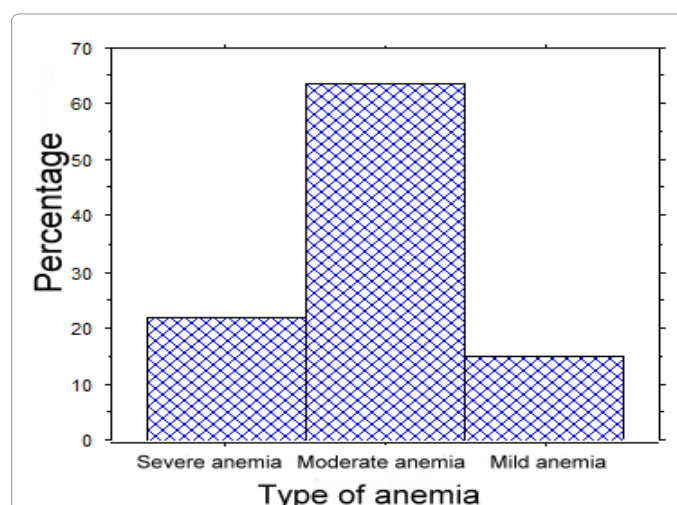


Figure 1: Distribution of anemic children (n=101) according to degree of anemia.

	Study Group (n=101) Mean $\pm$ Standard Deviation	Control Group (n=99) Mean $\pm$ Standard Deviation	P
Hemoglobin (g / dl)	08.40 $\pm$ 1.54	13.27 $\pm$ 1.17	<0.0001 S
Hematocrit (%)	27.61 $\pm$ 5.80	41.07 $\pm$ 4.21	<0.0001 S
RBC (x 10 ¹² /l)	3.78 $\pm$ 0.89	4.98 $\pm$ 0.66	<0.0001 S
MCV (fl)	72.97 $\pm$ 12.45	87.52 $\pm$ 8.78	<0.0001 S
MCH (pg)	24.72 $\pm$ 4.82	30.05 $\pm$ 3.59	<0.0001 S
MCHC (%)	30.58 $\pm$ 2.87	33.37 $\pm$ 2.29	<0.0001 S
FERRITIN (mg / l)	28.78 $\pm$ 25.07	106.60 $\pm$ 47.52	<0.0001 S
SERUM IRON (µg/100 ml)	45.67 $\pm$ 25.49	129.82 $\pm$ 31.20	<0.0001 S

Abbreviations: MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; MCV: Mean Corpuscular Volume; RBC: Red Blood Cell.

Table 1: Iron status parameters in the study group (anemic) and control group (no anemic).

	Study Group (n=101) Mean $\pm$ Standard Deviation	Control Group (n=99) Mean $\pm$ Standard Deviation	P
NEUTROPHIL (%)	45.04 $\pm$ 15.98	57.56 $\pm$ 16.26	<0.0001 S
LYMPHOCYTE (%)	43.68 $\pm$ 17.93	38.19 $\pm$ 16.69	0.026 S
MONOCYTE (%)	5.52 $\pm$ 3.72	4.57 $\pm$ 2.91	0.044 S
EOSINOPHIL (%)	0.88 $\pm$ 1.38	0.87 $\pm$ 0.93	0.979 NS
BASOPHIL (%)	0.30 $\pm$ 0.52	0.38 $\pm$ 0.60	0.318 NS

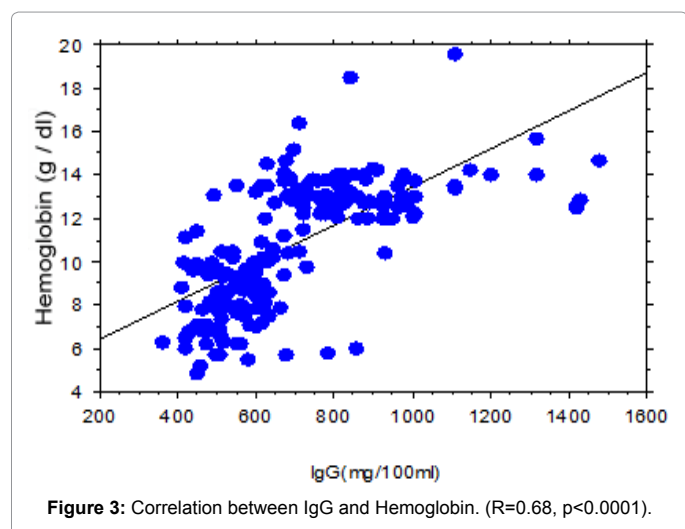
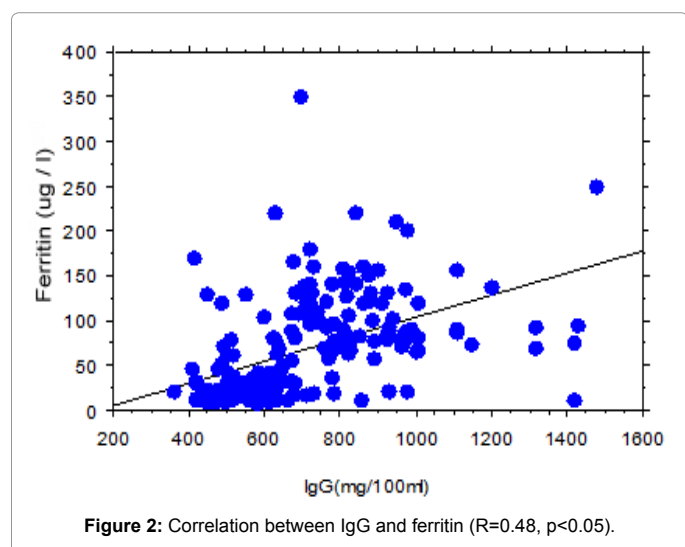
S: significant; NS: not significant

Table 2: Result of cellular immunity (%).

	Study Group (n=101) Mean $\pm$ Standard Deviation	Control Group (n=99) Mean $\pm$ Standard Deviation	P
IgG (mg/100 ml)	548.772 $\pm$ 91.885	852.714 $\pm$ 181.424	<0.0001 S
IgE (mg/100 ml)	0.223 $\pm$ 0.270	0.294 $\pm$ 0.314	0.0874 NS
IgA (mg/100 ml)	74.123 $\pm$ 35.109	94.936 $\pm$ 64.452	<0.0049 S
IgD (mg/100 ml)	4.729 $\pm$ 6.53	7.191 $\pm$ 6.439	<0.0081 S
IgM (mg/100 ml)	73.343 $\pm$ 31.013	76.911 $\pm$ 32.700	0.429 NS

Abbreviations: IgG: Immunoglobulin G; IgE: Immunoglobulin E; IgA: Immunoglobulin A; IgD: Immunoglobulin D; IgM: Immunoglobulin M; S: Significant; NS: Not Significant.

Table 3: Results of humoral immunity (mg/100 ml).



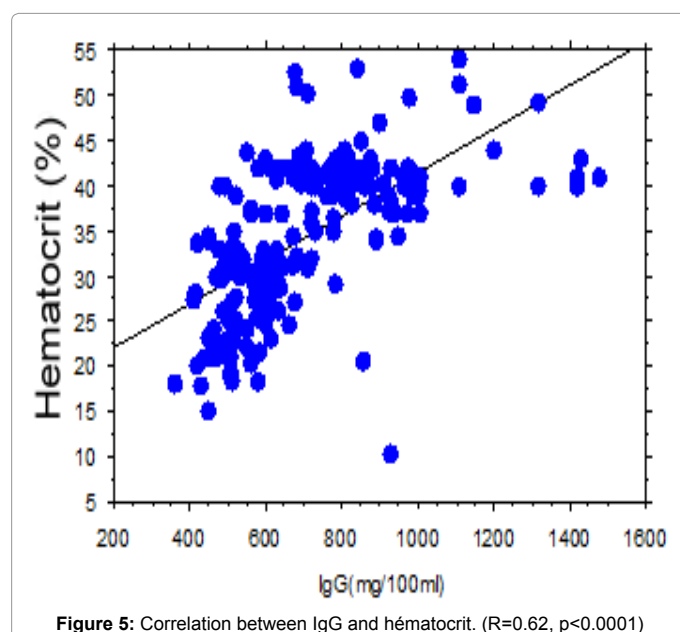
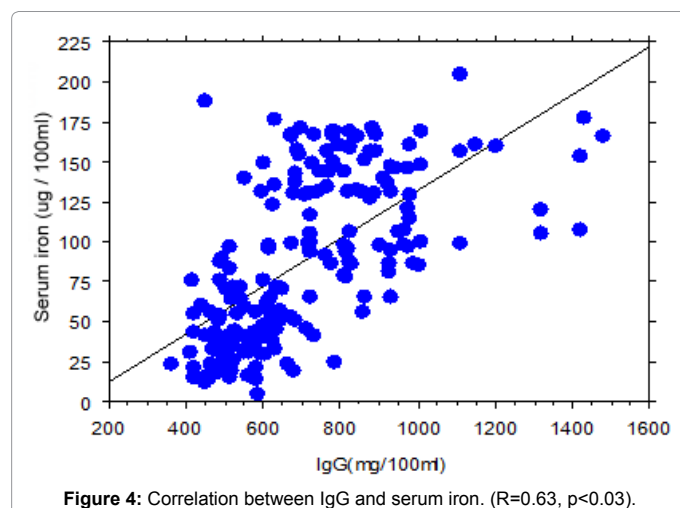
is of great importance. Iron deficiency is associated with impairment of innate (natural) immunity and cell mediated immunity, thereby contributing to increased risk of infections [6,7].

Deficiency of various essential vitamins and minerals such as iron, zinc, selenium, copper, vitamins A, C, E and pyridoxine, and folic acid individually have been shown to have important influences on immune responses and risk of infection. Iron deficiency is associated with impairment of cell mediated immunity and the bactericidal activity of neutrophils, thereby by increasing the susceptibility to infections [8,9].

Our study showed that 50.5% of children are anemic and 49.5% are not anemic. In developing countries are the most affected due to low bioavailability of iron in the diet, and the high incidence of parasitic diseases in some countries (malaria and intestinal parasites).

In our study, serum neutrophils level in anemic group was significantly lower than the control group. Reported immune defects in iron deficiency include decreased cell-mediated immunity, mitogen responsiveness and natural-killer cell activity. Neutrophil phagocytosis and B lymphocyte function are reported to be generally intact, but lymphocyte bactericidal activity is decreased [10].

In order to study humoral immunity we investigated serum levels of IgG, IgA, IgM, IgD in the study and the control group. There was statistically significant difference in IgG, IgD, IgA levels of both groups (study and control). Chandra et al. showed bactericidal defects in neutrophils of iron deficient patients and reported a resolution after parenteral iron treatment [2]. In 1975 he also showed a decrease in serum immunoglobulin levels [7,11,12]. Ekij et al. showed significantly reduced interleukin-6 levels, immunoglobulin G levels, oxidative



burst activity of neutrophils and monocytes, and phagocytic activity of monocytes in 6-24 months children [13]. The major limitation of both these studies is small number of subjects. However, another study indicated that iron deficiency does not impair humoral immunity [14,15].

Humoral immunity appears to be less affected by iron than cellular immunity deficiency. In humans iron deficiency, the production of antibodies in response to vaccination with most of the antigens is preserved [7,16-18].

Neutrophil and macrophage dysfunction has been associated with low iron levels, as evidenced by deficient nitroblue tetrazoleum reduction and hydrogen peroxide formation in these respective cell lines [19]. Ribonucleotide reductase activity has been discovered to be iron dependent. Iron levels have also been shown to alter the proliferation of T helper (Th)-1 and Th-2 subsets, likely related to the difference in dependence of cells on transferrin-related iron uptake [20,21].

In the present study, we noted that the rate of lymphocytes and *Monocyte* are significantly different between two groups (study and control).

The reported T-cell dysfunction may be the result of functional defects of T cells rather than quantitative defects. The first report investigating the effect of iron deficiency on T-cell function came from Joynson et al. in 1972. They showed negative effects of iron deficiency on adult cellular immunity [8,22]. In their study, the investigators found a decrease in DNA synthesis in the activated lymphocytes with PPD and in the formation of 'macrophage migration inhibition factor' and in delayed type of immune reaction after stimulation with PPD and *Candida* antigens. Higgs and Wells reported impaired cellular immune functions in iron deficiency and its relation to mucocutaneous candidiasis [12,23]. Following studies showed a decrease in T-cell numbers but *Van Heerden* in 1981 reported normal values [14,24,25]. In our study, we demonstrated that neutrophils levels were reduced in study group. There are many studies reporting decreased phagocytic and bactericidal activity in neutrophils, whereas little about the relationship with monocytes can be found in the literature [26,27].

There are several mechanisms that may explain the effects of iron on the immune system deficiency. DNA synthesis, ribonucleotide reductase enzyme containing iron-initiated is a factor limiting the speed in cell replication and can be limited by an iron deficiency. Control of cell differentiation is influenced by iron and iron transport in cells via the Transferrin receptor [28-30]. *GALAN* and *AI* reported a reduction in the production of interleukin-2 by lymphocytes activated in iron-deficient patients. The release of interleukin-2 is fundamental to communication between lymphocyte subpopulations and natural killer cells, but it doesn't seem to be the only cytokine which is modified by the iron status [29-31].

Humoral and cell mediated immunity both have been studied extensively, mainly *in vitro*, in relation to iron deficiency in both humans and animals. Impairment of cell mediated immunity have been well described in iron-deficient humans, however, little evidence exists for major humoral deficiencies. An increased susceptibility to infections has been observed in some patients with iron deficiency, etiology of which is not well known. Deficiency of iron and zinc are well documented to impair immune function in experimental animals and to the extent studied, in humans as well [27,30].

In summary, iron deficiency depresses certain aspects of cell-

mediated immunity and innate immunity. Because there are some conflicting effects of iron deficiency on defense systems, it becomes more important to review the relationship between iron deficiency and infection risk.

The proposed interventions rely primarily on enhancing iron intake either through supplementation or fortification of food. To conclude, we can say that iron deficiency can affect some humoral immunity and cell-mediated settings. More investigations are needed to clarify these results.

Conclusion

These results suggest that humeral and cell-mediated which have a crucial role in the different stages of the Immunogenic are affected by iron deficiency anemia. Iron deficiency is quite frequent in our study population. A comprehensive research in our country is needed on how to improve existing iron supplementation programs and nutritional status of children.

References

1. Cunningham-Rundles S (1982) Effects of nutritional status on immunological function. *Am J Clin Nutr* 35: 1202-1210.
2. Chandra RK (1973) Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency. *Arch Dis Child* 48: 864-866.
3. Bhaskaram C, Reddy V (1975) Cell-mediated immunity in iron- and vitamin-deficient children. *Br Med J* 3: 522.
4. Kramer JL, Baltathakis I, Alcantara OS, Boldt DH (2002) Differentiation of functional dendritic cells and macrophages from human peripheral blood monocyte precursors is dependent on expression of p21 (WAF1/CIP1) and requires iron. *Br J Haematol* 117: 727-734.
5. Collins HL (2003) The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol Lett* 85: 193-195.
6. Beard JL (2001) Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr* 131: 568S-579S.
7. Chandra RK (1977) Lymphocyte subpopulations in human malnutrition: cytotoxic and suppressor cells. *Pediatrics* 59: 423-427.
8. Joynson DH, Walker DM, Jacobs A, Dolby AE (1972) Defect of cell-mediated immunity in patients with iron-deficiency anaemia. *Lancet* 2: 1058-1059.
9. Ekiz C, Agaoglu L, Karakas Z, Gurel N, Yalcin I (2005) The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system. *Hematol J* 5: 579-583.
10. Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Meldrum KK, et al. (2007) The struggle for iron: gastrointestinal microbes modulate the host immune response during infection. *J Leukoc Biol* 81: 393-400.
11. Klebanoff SJ (1971) Intraleukocytic microbicidal defects. *Annu Rev Med* 22: 39-62.
12. Higgs JM, Wells RS (1972) Chronic mucocutaneous candidiasis: Associated abnormalities of iron metabolism. *Br J Dermatol* 86 (Suppl 8): 88.
13. Dallman PR (1987) Iron deficiency and the immune response. *Am J Clin Nutr* 46: 329-334.
14. van Heerden C, Oosthuizen R, van Wyk H, Prinsloo P, Anderson R (1981) Evaluation of neutrophil and lymphocyte function in subjects with iron deficiency. *S Afr Med J* 59: 111-113.
15. Kochanowski BA, Sherman AR. (1984). Phagocytes and lysozyme activity in granulocytes from iron deficient rat pups. *Nutr Res* 4: 511-520.
16. Hallquist NA, McNeil LK, Lockwood JF, Sherman AR (1992) Maternal-iron-deficiency effects on peritoneal macrophage and peritoneal natural-killer-cell cytotoxicity in rat pups. *Am J Clin Nutr* 55: 741-746.
17. Spear AT, Sherman AR (1992) Iron deficiency alters DMBA-induced tumor burden and natural killer cell cytotoxicity in rats. *J Nutr* 122: 46-55.
18. Kuvibidila SR, Kitchens D, Baliga BS (1999) In vivo and in vitro iron deficiency reduces protein kinase C activity and translocation in murine splenic and purified T cells. *J Cell Biochem* 74: 468-478.

19. Sussman M (1974) Iron and infection. In: Iron in Biochemistry and Medicine (Jacobs, A. & Worwood, A. M., edn), pp. 649-679. Academic Press, New York, NY.
20. Addison GM, Beamish MR, Hales CN, Hodgkins M, Jacobs A, et al. (1972) An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. J Clin Pathol 25: 326-329.
21. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Govoni G, Gros P (1999) The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. Proc Assoc Am Physicians 111: 283-289.
22. Hall A, Bobrow E, Brooker S, Jukes M, Nokes K, et al. (2001) Anaemia in schoolchildren in eight countries in Africa and Asia. Public Health Nutr 4: 749-756.
23. Hallberg L (1996) Iron nutrition in health and disease. John Libbey edn, London; 364.
24. OMS/UNICEF (2004) Joint statement: focusing on anemia towards an integrated approach for effective anaemia control; (OMS).
25. Oski FA (1993) Iron deficiency in infancy and childhood. N Engl J Med 329: 190-193.
26. Feng XB, Yang XQ, Shen J (1994) Influence of iron deficiency on serum IgG subclass and pneumococcal polysaccharides specific IgG subclass antibodies. Chin Med J (Engl) 107: 813-816.
27. Bagchi K, Mohanram M, Reddy V (1980) Humoral immune response in children with iron-deficiency anaemia. Br Med J 280: 1249-1251.
28. Kulapongs P, Vithayasai V, Suskind R, Olson RE (1974) Cell-mediated immunity and phagocytosis and killing function in children with severe iron-deficiency anaemia. Lancet 2: 689-691.
29. Moore LL, Humbert JR (1984) Neutrophil bactericidal dysfunction towards oxidant-radical sensitive microorganisms during experimental iron deficiency. Pediatr Res 18: 789-794.
30. Walter T, Arredondo S, Arévalo M, Stekel A (1986) Effect of iron therapy on phagocytosis and bactericidal activity in neutrophils of iron-deficient infants. Am J Clin Nutr 44: 877-882.
31. Yetgin S, Altay C, Ciliv G, Laleli Y (1979) Myeloperoxidase activity and bactericidal function of PMN in iron deficiency. Acta Haematol 61: 10-14.

Citation: Rahmani S, Demmouche A (2014) Iron Deficiency Anemia in Children and Alteration of the Immune System. J Nutr Food Sci 4: 333. doi:[10.4172/2155-9600.1000333](https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000333)

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 400 Open Access Journals
- 30,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: www.editorialmanager.com/acrgroup



LES

ARTICLES

ARTICLE 1

IRON DEFICIENCY ANEMIA IN CHILDREN AND ALTERATION OF THE IMMUNE SYSTEM.

Publié dans le journal suivant :



Journal of Nutrition & Food Sciences

Open Access

ISSN: 2155-9600

Index Copernicus Value: 6.28
Impact Factor: 3.48*

ARTICLE 2

IRON AND MICROBIAL GROWTH: PRODUCTION OF MICROBIAL IRON CHELATORS (SIDEROPHORES) BY PSEUDOMONAS.

Publié dans le journal suivant:



Journal of Disease and Global Health

2(3):74-80,2015

International Knowledge Press
www.ikpress.org



ISI Thomson Reuters ([PCBMB](#)), [SCImago Journal & Country Rank \(SJR\)](#) ([PCBMB](#)), [SCOPUS](#) ([PCBMB](#)), NAAS Rating 2.59 ([PCBMB](#)), ProQuest, EBSCOhost, Chemical Abstracts Service ("CAS"), HINARI, CAB abstract, Ulrich's, AGORA, Google scholar, journalSeek, [OARE](#), sciencemidia, ResearchBib, WZB database (Berlin, Germany), BIBSYS, ALADIN (WRLC Liberation), Econbiz, Research4Life database, WorldCat, The Knowledge NetWork,



IRON AND MICROBIAL GROWTH: PRODUCTION OF MICROBIAL IRON CHELATORS (SIDEROPHORES) BY PSEUDOMONAS

RAHMANI SORAYA¹ AND DEMMOUCHE ABBASSIA^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, University Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes, Algeria.

Original Research Article

ABSTRACT

Introduction: The relationship between Iron deficiency and infection susceptibility has been investigated as well. We aimed to study the effect of iron deficiency anemia (IDA) on immunity in 401 children with IDA and 226 normal children.

Methods: The percentage of Neutrophils, Lymphocytes, the level of immunoglobulin's and serum iron, Ferritin, Hb, MCV, Ht, MCHC, and MCH were compared. Our study was conducted in the hospital in Sidi Bel Abbes region (west of Algeria) and the sample consisted of 627 children.

Results: Our results show that there was no significant difference in age between patients and control group ($p=0.20$). There was a statistically significant difference between all hematologic and immunologic parameters between the two groups ($p<0.001$). The percentage of Neutrophils was 71.09 ± 5.02 in children with IDA and 58.74 ± 8.40 in the control group ($p<0.001$). The percentage of Lymphocytes was 41.38 ± 3.52 in children with IDA and 33.06 ± 4.98 in the control group ($p<0.001$). IgG level was 1493.14 ± 53.35 in children with iron deficiency and 1080.21 ± 216.48 in healthy children ($p<0.001$). Significant differences in levels of IgM (194.57 ± 33.38 in children with IDA to 141.23 ± 38.52 in the control group) ($p<0.001$) and IgA (461.71 ± 19.09 in children with iron deficiency to 278.87 ± 90.63 in healthy children) ($p<0.001$) were observed between the two groups. A susceptibility to infections has been observed in children with iron deficiency in our study. Our investigations have shed light on *Pseudomonas* addition to its ability to synthesize and release enterobactin-related siderophores as a way of obtaining iron from their environment. We continued our experiments in order to characterize the concentration of siderophores produced by 30 specimens of *pseudomonas* isolated from 30 children's with IDA and suffered from many diseases. In the same time, we found that the percentage of the siderophores was significantly suppressed by the addition of a Human serum in the medium of culture; it's extracted from these children and that we supposed, it contains a recombinant siderocalin (also known as

*Corresponding author: Email: demmoucheabbassia@yahoo.fr;

Lipocalin 2, Neutrophils gelatinase-associated lipocalin, NGAL), it is expressed by macrophages and Neutrophils in response to infectious and inflammatory stimuli.

Conclusion: These results suggest that Humoral and non specific immunity are influenced by iron deficiency and that the sequestration of iron-loaded siderophores by siderocalin represents a direct attack on an important iron acquisition mechanism.

Keywords: Iron deficiency, Immunity, Infection, siderophores, siderocalin, *Pseudomonas*.

ABBREVIATIONS

MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; MCV: Mean Corpuscular Volume; RBC: Red Blood Cell.. WBC: White Blood Cell.

1. INTRODUCTION

Iron deficiency is the most common micronutrient deficiency in the world. Children, particularly Infants are highly vulnerable to infectious diseases [1, 2]. Therefore, understanding the relationship between Iron deficiency and Infection is of great importance. The morbidity and mortality following infectious diseases is determined by acquisition of iron by the microbes. [3]. Pathogenic organisms have developed several ways of extracting iron from low host iron environment such as: secretion of siderophores (very high affinity for Fe^{+3}) which compete with transferring for iron and transport iron to the bacteria under normal physiological conditions (*Pseudomonas*, *klebsiella*, *E.coli* and *Candida* species) [4,5]. We under took this study with the aim of documenting the changes in Immunoglobulin's in children in the age of 2 to 10 years with Iron deficiency. We also currently conducting further our experiments to evaluate the concentrations of siderophores produced by 30 specimens of *Pseudomonas* isolated from children with IDA and suffering from many infections before and after the addition of human serum isolated from thus patients.

2. SUBJECTS AND METHODS

We aimed to study the effect of Iron deficiency Anemia IDA on Immunity in 401 children with IDA and 226 normal children. The percentage of Neutrophils, Lymphocytes, Level of immunoglobulin's and serum Iron, Ferritin, Hb, MCV, Ht, MCHC, MCH were compared. Colorimetric estimation of serum iron (Biomerieux-France) and estimation of serum ferritin by ELISA (kit supplied by Drg. International Inc, USA.).

While we have been working to elucidate the abnormalities associated with iron deficiency and the production of siderophores, we have also been trying to develop a practical application of our findings. We have focused on siderocalin; it's a number of the lipocalin family that has been shown recently to have antimicrobial functions based on iron deprivation. We added a human serum that we supposed it contains

this component (because it is an extra cellular element and it is expressed by macrophages and Neutrophiles in response to infectious and inflammatory stimuli) in the bacterial medium and we compared the concentration of siderophores before and after the addition of this human serum.

Methods and procedures are described for the identification of aerobic *Pseudomonas* isolated from clinical specimens. In our study, we aim to isolate *Pseudomonas* from various sources such as blood, saliva and feces from children with several infections and particularly pulmonary's. Fluorescence is used as a means of primary differentiation.

Because pigment formation and motility are key characteristics, all cultures received were first inoculated in of cétrimide agar overnight incubation at 37°C and then examining for fluorescence by means of Ultra-Violet light (360 nm).Growth at 41°C was recorded after inoculation in of King B agar; motility was observed microscopically by the hanging-drop method and then oxidase tests, Gram were done.

The remaining of 87 cultures were tested for all the characteristics described above; on the basis of fluorescence and Pyoverdine pigment production, 30 were considered to be *Pseudomonas aeruginosa*.

The ability to produce pyoverdine pigment was determined in of GUM medium reported by Meyer and Abdellah, 1978 and measured by Spectrophotometer at 400nm before and after the addition of the human serum.

3. RESULTS

The percentage of Lymphocyts was (41.38 ± 3.52 %) in children with IDA and (33.06 ± 4.98 %) in the control group ($p < 0.001$). The percentage of Neutrophils was (71.09 ± 5.02 %) in children with IDA and $58.74 \pm 8.40\%$ in the control group ($p < 0.001$). IgG level was (1493.14 ± 53.35 mg/dl) in children with iron deficiency and (1080.21 ± 216.48 mg/dl) in healthy children ($p < 0.001$). IgM level was (194.57 ± 33.38 mg/dl) in children with IDA and (141.23 ± 38.52

mg/dl) in the control group ($p < 0.001$). IgA was (461.71 ± 19.09 mg/dl) in children with iron deficiency and (278.87 ± 90.63 mg/dl) in healthy children ($p < 0.001$), (Table 1, Table 2).

There was a significant difference between the two groups (control and study) in the distribution of various hematological and biochemical parameters (serum iron, ferritin, Hb, MCV, Ht, MCHC, MCH), ($P < 0.05$), (Table 3).

Our results showed that there is a variation in the concentration of the siderophores after the addition of the human serum. The specimens: B0S-0($2.39 \mu\text{mol/ml}$ against $1.29 \mu\text{mol/ml}$); B0S-1($2.32 \mu\text{mol/ml}$ against $1.11 \mu\text{mol/ml}$); B0S-2($1.97 \mu\text{mol/ml}$ against $1 \mu\text{mol/ml}$); C33-1($2.33 \mu\text{mol/ml}$ against $1.57 \mu\text{mol/ml}$); C33-3 ($2.18 \mu\text{mol/ml}$ against $1.29 \mu\text{mol/ml}$); C33-4($1.46 \mu\text{mol/ml}$ against $1.41 \mu\text{mol/ml}$); C33-5($2.65 \mu\text{mol/ml}$ against $1.40 \mu\text{mol/ml}$); C33-6($1.64 \mu\text{mol/ml}$ against $1.38 \mu\text{mol/ml}$); M30-1($2.03 \mu\text{mol/ml}$ against 1.10); M30-2($1.67 \mu\text{mol/ml}$ against $1.18 \mu\text{mol/ml}$); M30-4($1.43 \mu\text{mol/ml}$ against $1.08 \mu\text{mol/ml}$); G20-5($2.08 \mu\text{mol/ml}$ against $1.4 \mu\text{mol/ml}$); G20-6($2.12 \mu\text{mol/ml}$ against $1.09 \mu\text{mol/ml}$); L10-1($2.62 \mu\text{mol/ml}$ against $1.58 \mu\text{mol/ml}$); L10-3($1.91 \mu\text{mol/ml}$ against $1.11 \mu\text{mol/ml}$);

L10-4($2.14 \mu\text{mol/ml}$ against $1.02 \mu\text{mol/ml}$); L10-5($2.20 \mu\text{mol/ml}$ against $1.29 \mu\text{mol/ml}$); L10-7($2.16 \mu\text{mol/ml}$ against $1.51 \mu\text{mol/ml}$); L10-8($2.34 \mu\text{mol/ml}$ against $1.18 \mu\text{mol/ml}$); L10-9($1.47 \mu\text{mol/ml}$ against $1.12 \mu\text{mol/ml}$) were significantly suppressed by the addition of the human serum. The maximal concentration was attributed to the specimen C33-2 in the two sides (after and before the addition of the human serum). We found also a significant augmentation in the concentration of the siderophores after the addition of the human serum in the specimens: M30-3($0.13 \mu\text{mol/ml}$ against $1.22 \mu\text{mol/ml}$); M30-4($1.43 \mu\text{mol/ml}$ against $1.08 \mu\text{mol/ml}$); M30-5($0.13 \mu\text{mol/ml}$ against $1.69 \mu\text{mol/ml}$); M30-6($1.92 \mu\text{mol/ml}$ against $3.26 \mu\text{mol/ml}$); G20-1($0.13 \mu\text{mol/ml}$ against $1.37 \mu\text{mol/ml}$); G20-2($1.18 \mu\text{mol/ml}$ against $1.67 \mu\text{mol/ml}$); G20-3($0.97 \mu\text{mol/ml}$ against $1.54 \mu\text{mol/ml}$); L10-2($1.60 \mu\text{mol/ml}$ against $2.85 \mu\text{mol/ml}$); L10-6($1.38 \mu\text{mol/ml}$ against 1.52); It may be a form of resistance appeared to be of clinical importance; but looking to the different concentrations produced after and before the addition of the human serum and the illustrations of the graphics and the histograms: we can say that the concentrations of siderophore was significantly modified by the addition of the human serum (Table 4, Table 5), (Fig. 1, Fig. 2).

Table 1. Results of cellular Immunity (%)

	Study group (n=401)	Control group(n=226)	P	
Neutrophils (%)	71.09 $\pm$ 5.02	58.74 $\pm$ 8.40	<0.001	S
Lymphocytes (%)	41.38 $\pm$ 3.52	33.06 $\pm$ 4.98	<0.001	S

Table 2. Results of Humoral Immunity (mg/100ml)

	Study group (n=401)	Control group(n=226)	P	
IgA (mg/100 ml)	461.71 $\pm$ 19.09	278.87 $\pm$ 90.63	<0.001	S
Ig M (mg/100 ml)	194.57 $\pm$ 33.38	141.23 $\pm$ 38.52	<0.001	S
IgG (mg/100 ml)	1493.14 $\pm$ 53.35	1080.21 $\pm$ 216.48	<0.001	S

Table 3. Results of Hematologic parameters

	Study group (n=401)	Control group(n=226)	P	
Age (years)	7.27 $\pm$ 2.7	6.97 $\pm$ 3.0	0.20	NS
RBC (x 10 ¹² /l)	4.08 $\pm$ 0.31	4.76 $\pm$ 0.86	<0.001	S
WBC (x 10 ⁹ /l)	11.42 $\pm$ 1.05	7.73 $\pm$ 0.85	<0.001	S
Hematocrit (%)	31.92 $\pm$ 3.24	39.34 $\pm$ 3.25	<0.001	S
MCH (pg)	24.35 $\pm$ 1.66	29.46 $\pm$ 1.77	<0.001	S
MCHC (g/dl)	27.88 $\pm$ 2.21	33.55 $\pm$ 1.87	<0.001	S
MCV (fl)	27.88 $\pm$ 2.21	90.12 $\pm$ 7.32	<0.001	S
SERUM IRON (μg/100 ml)	49.68 $\pm$ 68	111.16 $\pm$ 22.19	<0.001	S
FERRITIN (mg / l)	10.64 $\pm$ 5.62	30.26 $\pm$ 15.02	<0.001	S

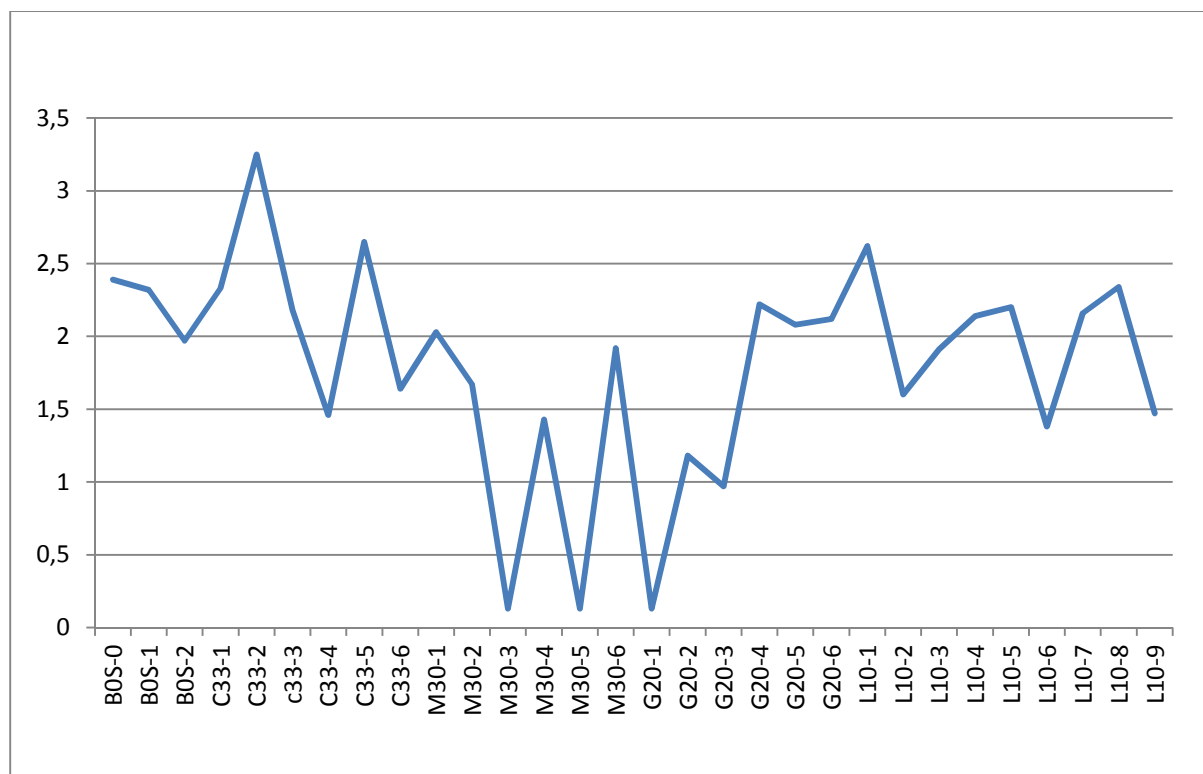


Fig. 1. Concentration of siderophores produced before the addition of human serum

Table 4. Concentration of siderophore produces before the addition of human serum

Specimen's designation										
	B0S-0	BS0-1	BS0-2	C33-1	C33-2	C33-3	C33-4	C33-5	C33-6	M30-1
DO(0)	1.15	1.30	1.42	1.31	1.30	1.05	1.17	1.06	1.05	1.30
DO	0.06	0.07	0.09	0.07	0.05	0.06	0.1	0.05	0.08	0.08
[C]μmol/ml	2.39	2.32	1.97	2.33	3.25	2.18	1.46	2.65	1.64	2.03

	M30-2	M30-3	M30-4	M30-5	M30-6	G20-1	G20-2	G20-3	G20-4	G20-5
DO(0)	1.07	1.04	1.03	1.06	1.08	1.04	1.04	1.4	1.6	1.5
DO	0.08	0.01	0.09	0.01	0.07	0.01	0.11	0.18	0.09	0.09
[C]μmol/ml	1.67	0.13	1.43	0.13	1.92	0.13	1.18	0.97	2.22	2.08

	G20-6	L10-1	L10-2	L10-3	L10-4	L10-5	L10-6	L10-7	L10-8	L10-9
DO(0)	1.02	1.05	1.03	1.07	1.03	1.06	1.00	1.04	1.05	1.06
DO	0.06	0.05	0.08	0.07	0.09	0.06	0.09	0.06	0.08	0.09
[C]μmol/ml	2.12	2.62	1.60	1.91	2.14	2.20	1.38	2.16	2.34	1.47

4. DISCUSSION

Our study demonstrated quantitatively the relationship between the severity of Hematological and Immunological compromise. The clinical and the epidemiological implications of this relationship have topical relevance since Iron deficiency is the most common micronutrient deficiency worldwide. [6].

An increased susceptibility to infections has been observed in patients with iron deficiency. Our study

was conducted on children of 2 to 10 years. Thus, we have excluded any influence of age on immune function.

Iron is essential for proper cell differentiation and cell growth. It is an important component of peroxide-generating enzymes and nitrous oxide-generating enzymes that are critical for proper enzymatic functioning of immune cells [7]. It is also involved in regulation of cytokine production and action as well in the development of cell mediated Immunity [8].

Spear and Sherman demonstrated that Iron is an integral component of enzymes myeloperoxidase (MPO), which produces reactive oxygen intermediates responsible for intracellular killing of pathogens [4, 9].

Neutrophils and Lymphocytes dysfunction has been associated with low iron levels, as evidence by deficient nitroblue tetrazoleum reduction and hydrogen peroxide formation in this respective cell lines [1, 10]. Ribonucleotide reductase activity has been discovered to be iron dependent [5].

Few studies have reported decreased risk of infection during iron deficiency [11]. The mechanisms of resistance against infections such as antibacterial

properties of tissue require a virtual iron free environment to function properly [12]. Earlier studies conducted in developed countries tented to support the value of iron supplements in reducing rates of respiratory infections in infants [13].

Biological fluids contain low level of NGAL-protein at steady state level. Serum contains approximately 20 ng/ml NGAL. Siderocalin, a member of lipocalin family of binding-proteins, is founded in Neutrophils granules, uterine secretions and markedly elevated level in serum and synovium during bacterial infection; it's also secreted from epithelial cells in response to inflammation or tumor genesis [14].

Table 5. Concentration of siderophores produced after the addition of human serum

Specimen's designation										
	B0S-0	BS0-1	BS0-2	C33-1	C33-2	C33-3	C33-4	C33-5	C33-6	M30-1
DO(0)	1.45	1.70	1.7	1.64	1.81	1.55	1.47	1.46	1.55	1.59
DO	0.14	0.19	0.20	0.13	0.06	0.15	0.13	0.13	0.14	0.18
[C] μ mol/ml	1.29	1.11	1.07	1.57	3.77	1.29	1.41	1.4	1.38	1.10

	M30-2	M30-3	M30-4	M30-5	M30-6	G20-1	G20-2	G20-3	G20-4	G20-5
DO(0)	1.71	1.47	1.73	1.63	1.83	1.54	1.47	1.48	1.63	1.58
DO	0.18	0.15	0.20	0.12	0.07	0.14	0.11	0.12	0.17	0.14
[C] μ mol/ml	1.18	1.22	1.08	1.69	3.26	1.37	1.67	1.54	1.19	1.41

	G20-6	L10-1	L10-2	L10-3	L10-4	L10-5	L10-6	L10-7	L10-8	L10-9
DO(0)	1.14	1.65	1.83	1.70	1.73	1.55	1.46	1.45	1.52	1.62
DO	0.16	0.13	0.08	0.19	0.21	0.15	0.12	0.14	0.16	0.18
[C] μ mol/ml	1.09	1.58	2.85	1.11	1.02	1.29	1.52	1.51	1.18	1.12

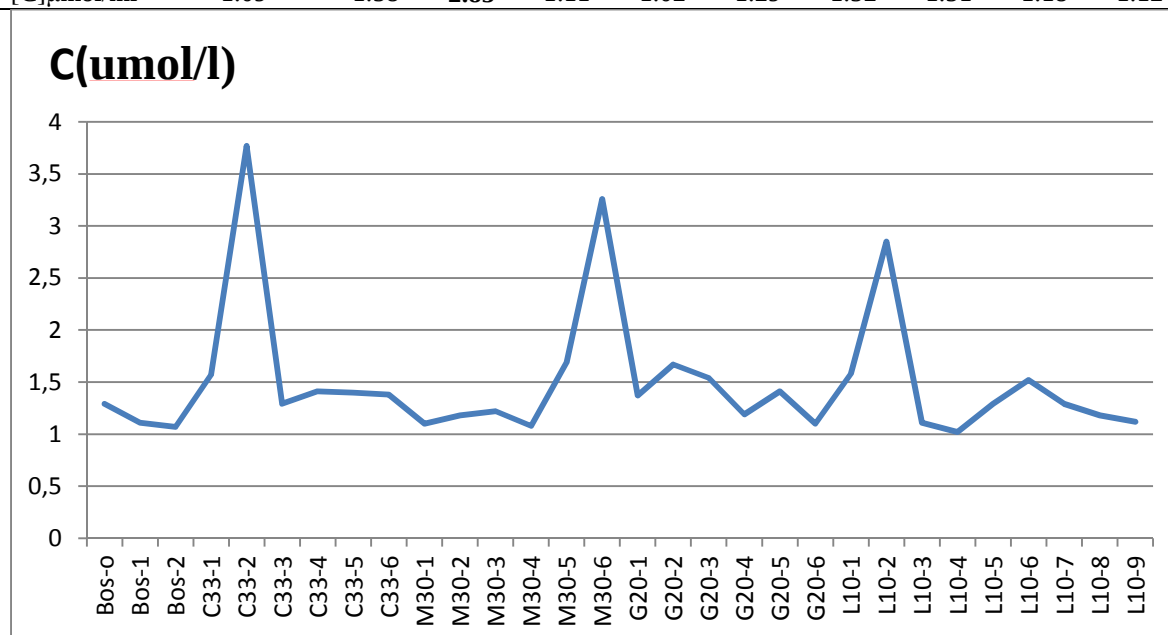


Fig. 2. Concentration of siderophores produced after the addition of human serum

Identification of high affinity ligands, suggested a possible function as an antimicrobial innate immune system. Supporting this hypothesis, Siderocalin is a potent bacteriostatic agent [15].

A signifant advanced in understanding the function of siderocalin occurred that functioned as a siderophores or iron scavenger [16]. In addition to its ability to sequester enterobactin like siderophores, siderocalin has also been shown recently to bind a different category of siderophores, Saiga and all demonstrated that siderocalin is involved in inhibiting *mycobacterium Tuberculosis* multiplication in vitro and in vivo [3].It has generally been assumed that the bacteriostatic action of siderocalin is based on its ability to bind bacterial siderophores. These investigations provide support for earlier suggestions that siderocalin may be involved in moving iron into or out of cells [17, 18].

5. CONCLUSION

Iron deficiency is associated with impairment of innate (natural) immunity and cell mediated immunity, thereby increased risk of infections. The iron acquisition by the microbes and their virulence is determined by various host and microbial mechanisms. Altering these mechanisms might provide modes of future therapy to infectious diseases.

We might need a different modality of antimicrobial treatment in future. Further experimental and clinical trials are needed to determine the appropriate levels of ambient iron needed to keep the host immune system at peak function, while at the same time, preventing microbial proliferation.

CONSENT

All authors declare that ‘written informed consent was obtained from the patient (or other approved parties) for publication of this case report and accompanying images.

ETHICAL APPROVAL

All authors hereby declare that all experiments have been examined and approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Bear JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning's Nutr; (2001). 131:568S-580S.
2. Chandra RK. Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency. Arch Dis Child; (1973). 48:864-866.
3. Cantwell RJ. Iron deficiency anemia of infancy: some clinical principles illustrated by the response of Maori infants to neonatal parenteral iron administration. Clin Pediatr; (1972). 11:443-449.
4. Erik C, Agaoglu L, Karakas Z, Gurel N, Yalcin I. The effect of iron deficiency anemia on the function of immune system. Hematol j; (2005). 5:579-583.
5. Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. Semin Hematol; (2009). 46: 387-393.
6. Harrison, F. & Buckling, A. Cooperative production of siderophores by *Pseudomonas aeruginosa*. Front. Biosci. (2009). 14, 4113–4126.
7. Greenwald J, Hoegy F, Nader M et al. Real time fluorescence resonance transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. The role of ferrous iron. J Biol Chem. (2007). 282:2987–2995
8. Hannauer M, Yeterian E, Martin LW et al. An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett. (2010a). 584:4451–4455
9. Hannauer M, Barda Y, Mislin GLA et al. The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferri-ferrichrome. J Bacteriol. (2010b) 192:1212–1220
10. Hannauer M, Schäfer M, Hoegy F et al. Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with myristic and myristoleic acid chain. FEBS Lett. (2012). 586:96–101
11. Reimann C. Inner-membrane transporters for the siderophores pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa* and enantio-pyochelin in *Pseudomonas fluorescens* display different enantioselectivities. Microbiology. (2012). 158:1317–1324
12. Bodilis, J., Ghysels, B., Osayande, J., Matthijs, S., Pirnay, J.-P., Denayer, S., De Vos, D. et al. Distribution and evolution of ferripyoverdine receptors in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. (2009). 11, 2123–2135.

13. Buckling, A., Harrison, F., Vos, M., Brockhurst, M.A., Gardner, A., West, S.A. & Griffin, A. et al. Siderophore-mediated cooperation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS. Microbiol. Ecol., (2007). 62, 135–141
14. De Chial, M., Ghysels, B., Beatson, S.A., Geoffroy, V., Meyer, J.M., Pattery, T., Baysse, C. et al. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, (2003). 149, 821–831.
15. Cornelis, P. & Matthijs, S. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. Environ. Microbiol., (2002). 4, 787–798.
16. Cornelis, P., Hohnadel, D. & Meyer, J.M. Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. Infect. Immun., (1989). 57, 3491–3497.
17. De Vos, D., De Chial, M., Cochez, C., Jansen, S., Tummeler, B., Meyer, J.M. & Cornelis, P. et al. Study of pyoverdine type and production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients: prevalence of type II pyoverdine isolates and accumulation of pyoverdine-negative mutations. Arch. Microbiol., (2001). 175, 384–388.
18. Ghysels, B., Dieu, B.T.M., Beatson, S.A., Pirnay, J.P., Ochsner, U.A., Vasil, M.L. & Cornelis, P. et al. Fpvh, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, (2004). 150, 1671–1680