

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE**  
**FACULTE DE SCIENCE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



En vue de l'obtention du diplôme de Master II en science biologique  
Spécialité : Biochimie Appliquée.

THEME :

## Recherche des infections fongiques chez des enfants autistes

**Présenté par :**

**Melle Lakel hadjer fatiha et Melle Serkisti rayane**

**Dirigé par :**

☐ **Promotrice:** Harouz Habiba MCB

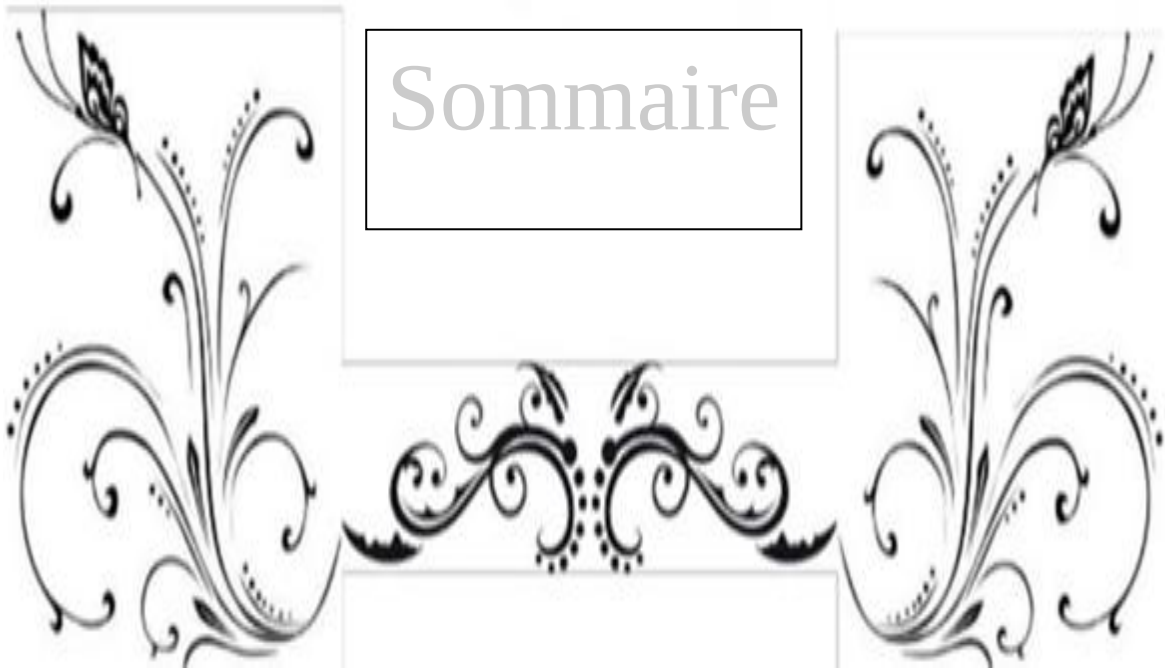
**Jurry :**

☐ **Le président :**

☐ **Examineur :**

☐ **Examineur :**

# Sommaire



# Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviation

## **Introduction**

### **Chapitre I : l'autisme**

-I-1-Définition de l'autisme

-I-2-Symptôme de l'autisme

I-2-1-Chez un nourrisson :

I-2-1-1- 0 à 6 mois :

I-2-1-2- 6 à 12 mois :

I-2-2-Chez un bébé :

I-2-2-1- 12 à 24 mois :

I-2-2-2 Après 24 mois :

I-2-3 Chez un enfant :

-I-3- Diagnostique de l'autisme

I-3-1-Altération qualitative des interactions sociales :

I-3-2-Altération qualitative de la communication ;

-I-4-Autisme et immunité

-I-5-Autisme et infection

-I-6-Autisme et infection fongique

-I-7- Autisme et mycotoxines

## **Chapitre II : Matériel et méthode**

### II-1-Recherche des infections urinaires

II-1-1- Cadre de l'étude

II-1-2- Population d'étude

II-1-3- Recueil des urines

II-1-4-Transport et congélation d'urine :

### II-2-matériel et méthode :

#### II-2-1- matériel :

##### II-2-1-1-matériel utilisé :

##### II-2-1-2-Milieu et produit utilisé :

##### II-2-1-2-1-Gélose sabouraud chloramphénicol agar :

##### II-2-1-2-2-Le gélose PCA (plate count agar) :

##### II-2-1-2-3-TRYPTONE SEL EAU (TSE) :

#### II-2-2- Méthode

##### II-2-2-1-Etude macroscopique :

##### II-2-2-2-Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

##### II-2-2-3-Examen microscopique (cytologies) ;

##### II-2-2-4-Cellule de malassez :

##### II-2-2-5-Examen bactériologique

##### II-2-2-5-1-*Isolement sur milieu PCA*

##### II-2-2-5-2-*Isolement sur milieu sabouraud :*

## **Chapitre III : Résultats**

### III-1-1-Résultat Selon l'aspect :

### III-1-2-Résulta Selon la couleur :

### III-1-3-Résultats de l'examen bactériologie :

### III-1-4-Résultat des cellules mallassez:

## Chapitre VI : Discussion

### III-2-Discussion :

III-2-1-Analyse de l'aspect d'urine :

III-2-2-Analyse de la couleur d'urine :

III-2-3-Analyse des résultats de l'infection urinaire :

III-2-4-Analyse microscopique

## **Conclusion**



Je dédie ce travail au plus gentil du papa, l'amie, et le frère qui m'a  
Toujours encouragé, qui m'a aidé à surmonté les difficultés de la vie.....Voilà  
Papa **Lounes**, reçois ce travail comme le fruit de ta patience et la  
Récompense de tous les moments qui tu as supporté à mon égard.  
A celle qui m'a mise au monde, Ma douce et chère mère qui m'a donné le gout  
De vivre et le gout d'apprendre.....Voilà maman **Nadia**, et reçois ce travail en  
Témoignage de tous les espoirs que t'avais placé en moi. Pour la décrire il me faudra quelque  
chose de plus que des mots, car quelque soit le terme et quelque soit l'expression, rien ne saura  
la tracer à mes yeux telle que mon cœur la voit et l'aperçois Celle qui me donne la force et la  
volonté.

A mon chère frère nadjib et sa femme fareil

A mon chère frère radouane et sa femme sara

A ma *sœur* sara et son mari mohamed avec ses enfants : *aya et ritadj et youcef*

*et ma sœur racha*

Qui n'ont jamais cessé de prier pour moi, qui ont toujours été à mes côtés et m'ont tendu la  
main dans les moments les plus difficiles. Acceptez donc ici l'hommage de ma gratitude et mon  
grand merci.

A mon grande père, mes oncles en particulie youcef ,mohamed ,omar et leurs femmes ,  
mes cousins et mes

Cousines, mes tantes, et à toute ma famille.

A ma chère copine et binôme RAYANE, et mes chères amies (hanane, randa , asma, sonia,  
zineb, souad, sara, imane, louiza, lamia ) qui ont été à mes  
côtés, je vous souhaite une merveilleuse vie.

A toute les membres de club scientifique bio best

*A toute la promotion de biochimie appliquée.*

*A toutes les personnes m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire. A tous mes professeurs dans tous les cycles de ma scolarité qui mon éclairé la voie du savoir.*

A tous ; ceux que je connais et que j'aime.

Aussi beaucoup d'autres personnes que je n'ai pas eu l'occasion de les  
Mentionner

## Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et

Ma réussite, à ma mère Zahia. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A mon cher père Abed-alkader. Qui m'a soutenu, veillé tout au long de ma vie à m'encourager.

Puisse dieu te garder et te procurer santé et longue vie, sois fier de moi aujourd'hui.

A mes chères sœurs Doria, Aya pour toute l'affection qu'elles m'ont donnée.

A mes chers frères Aymen, Mohammed, Nadjib, Zino et Kader.

Avec eux j'ai partagerai ma vie, et avec eux j'ai passé des moments agréables, ils m'ont encouragé pour réaliser mon rêve après longues années d'étude.

Pour mes très chères amies Khaoula, Amel, Meryem, Halla, Amira, Sarah, Nadia, Safia, Wahiba,

A mon amie, binôme, collègue, partenaire dans tout Fatiha hadjer Je te souhaite tout ce que tu veux avec une vie pleine de la joie et de succès.

A toutes les personnes m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire.



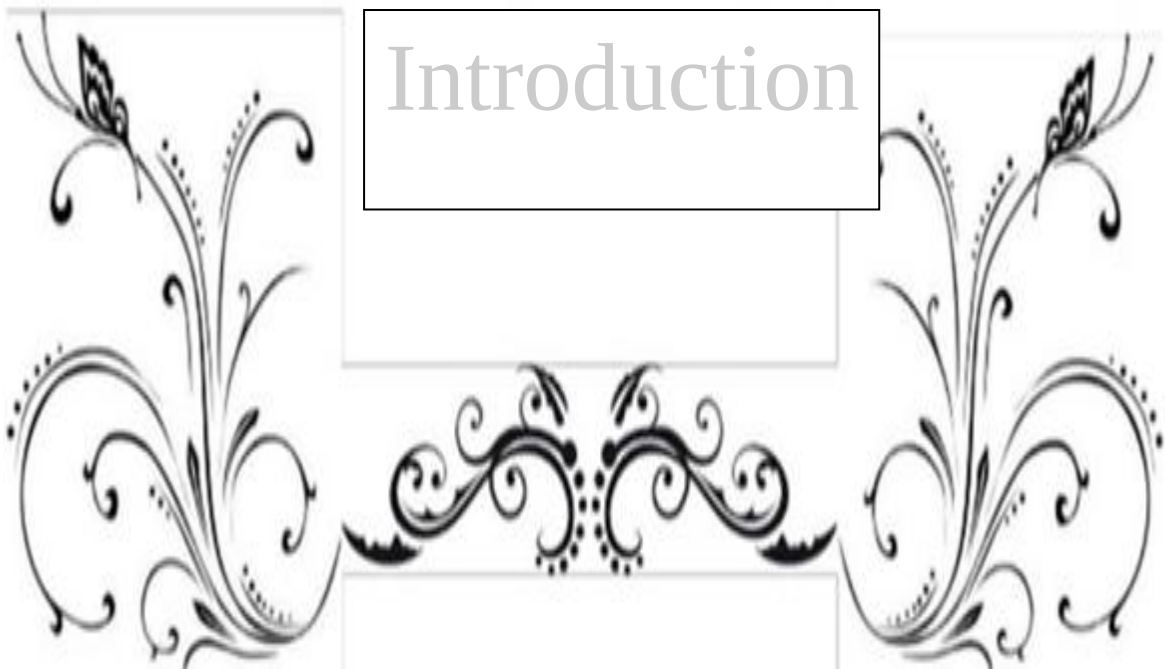
## Liste des figures :

| Numéro de la figure | Titre de la figure                                                                 |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Figure 1            | tube à essai                                                                       |
| Figure 2            | biote de pétri                                                                     |
| Figure 3            | lame                                                                               |
| Figure 4            | cellule de mallasse                                                                |
| Figure 5            | Microscope optique                                                                 |
| Figure 6            | Etuve                                                                              |
| Figure 7            | pipette pasteur                                                                    |
| Figure 8            | Bec bunsen                                                                         |
| Figure 9            | micropipette                                                                       |
| Figure 10           | Microonde                                                                          |
| Figure 11           | Autoclave                                                                          |
| Figure 12           | balance                                                                            |
| Figure 13           | Une centrifugeuse                                                                  |
| Figure 14           | bécher et fiole                                                                    |
| Figure 15           | eau distillés                                                                      |
| Figure 16           | les biotes stériles                                                                |
| Figure 17           | SABOURAUD CHLORMPHENICOL GELOSE MILIEU.                                            |
| Figure 18           | milieu de culture PCA.                                                             |
| Figure 19           | TRYPTONE SEL EAU                                                                   |
| Figure 20           | Macroscopie des urines                                                             |
| Figure 21           | repartitions des résultats d'aspect urinaire                                       |
| Figure 22           | Répartition des résultats des urines selon la couleur                              |
| Figure 23           | Résultats positifs sur pca                                                         |
| Figure 24           | résultat négatif sur pca                                                           |
| Figure 25           | Résultat positif Sur sabouraud                                                     |
| Figure 26           | résultat négatif Sur sabouraud                                                     |
| Figure 27           | Répartition des résultats d'infection urinaire et infection fongique               |
| Figure 28           | Résultat des leucocytes et cristaux sur microscope optique<br>(grossissement * 40) |
| Figure 29           | Répartition des résultats de la cellule malassez                                   |
| Figure 30           | Schéma présente le sédiment urinaire                                               |

## Liste des tableaux :

| Numéro de tableau | Titre de tableau                                    |
|-------------------|-----------------------------------------------------|
| Tableau 1         | résultat d'aspect des urines                        |
| Tableau 2         | résultat d'urine selon la couleur                   |
| Tableau 3         | résultat d'infection urinaire et infection fongique |
| Tableau 4         | réparation des résultats microscopique              |

# Introduction



# Introduction

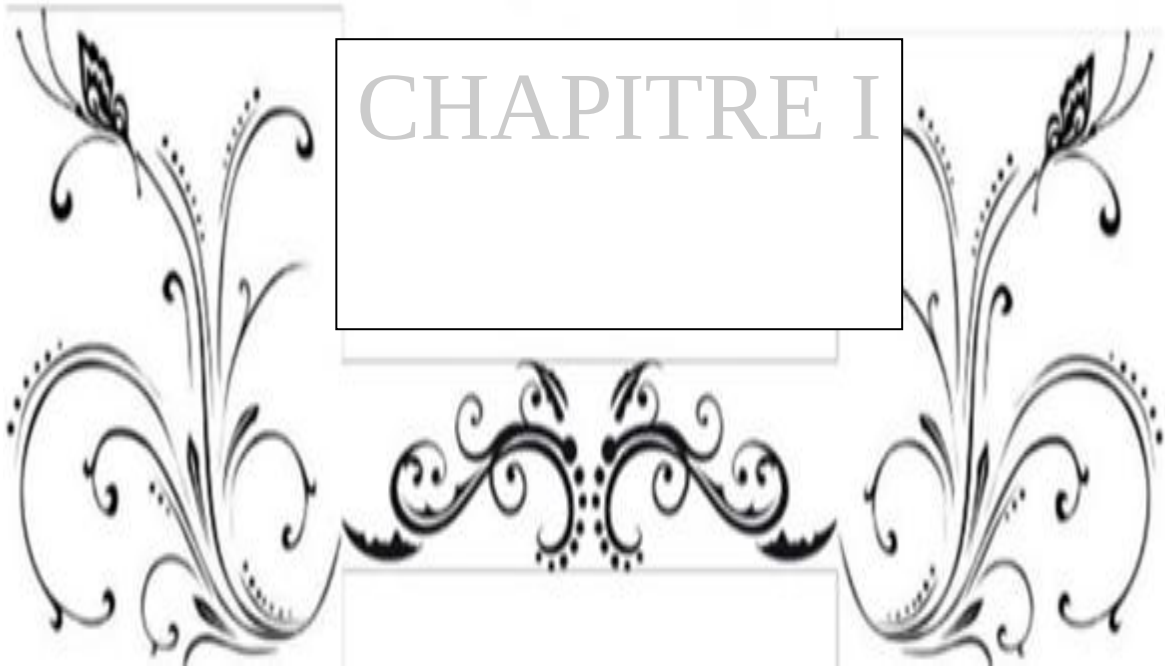
L'autisme est un trouble envahissant du développement (TED) qui apparaît précocement au cours de l'enfance et persiste à l'âge adulte. Il se manifeste par des altérations dans la capacité à établir des interactions sociales et à communiquer, ainsi que par des troubles du comportement. Les publications des taux de prévalence de l'autisme et des TED font état de résultats certes divergents mais globalement en augmentation. Il est désormais bien établi que l'autisme et les autres TED sont des maladies dont l'origine est multifactorielle, avec une forte implication de facteurs génétiques. Mais cela n'explique pas tout(1).

Aujourd'hui, on ne guérit pas l'autisme mais une prise en charge précoce conditionne, en partie, l'évolution de l'enfant autiste et ses chances de progression. Grâce aux progrès des techniques de séquençage à haut débit pour l'étude du génome, la recherche sur le microbiote connaît une explosion ces dernières années. Plusieurs travaux ont montré son influence sur des pathologies comme l'obésité et le diabète ou encore les allergies alimentaires. Plusieurs études ont montrés qu'il y a des différences dans la composition de microbiote des enfants atteint d'autisme par rapport aux enfants normaux. Leur microbiote est pauvre en certaines populations bactériennes en plus qu'une forte présence de bactéries pathogènes et champignons.

Des études récentes ont montré que la présence des champignons et bactéries pathogènes chez les enfants autistes n'est pas seulement dans le microbiote, mais également dans le sang. Des formes atypiques de bactéries et champignons sans paroi baignent dans le sang des enfants autistes et échappent au système immunitaire.

Les infections fongiques chez les enfants autistes ont été toujours mises en évidence par la recherche des mycotoxines dans les urines par chromatographie couplée à la spectrophotométrie de masse. La présence de ces toxines dans les urines témoigne de la présence de l'infection, mais ne permet pas la localisation de l'infection dans le corps. Dans la présente étude : les infections fongiques ont été recherchées dans les urines des enfants autistes en comparaison avec des enfants normaux par des simples cultures.

# CHAPITRE I



# **Chapitre I :**

## **I- l'autisme**

### **I-1-Définition :**

L'autisme est un trouble envahissant du développement (TED), caractérisé par un développement anormal ou déficient, manifesté avant l'âge de trois ans, avec une perturbation caractéristique du fonctionnement des trois domaines suivants : interactions sociales réciproques, communication, comportement ou caractère restreint et répétitif qui touche 1% dans le monde(2).

L'autisme est une maladie neurobiologique qui affecte le fonctionnement du cerveau et des systèmes immunitaires et biologiques. Il modifie également la capacité à reconnaître les expressions faciales, les codes sociaux et émotionnels, et conduit à une hypersensibilité émotionnelle et à des troubles du comportement cependant.

Pour la première fois l'autisme a été défini par Léo Kenner en 1940 comme « troubles autistiques de contact affectif » et il est reconnu comme un handicap depuis 1996 (3).

### **I-2--Symptôme :**

#### **-I-2-1-Chez un nourrisson :**

##### 0 à 6 mois :

Le nourrisson est très calme ou très excité il ne peut pas faire la différence de sons

Une anomalie du regard.

Absence de sourire chez un nourrisson de 3 mois plus.

Le nourrisson est trop mou ou trop raide.

##### 6 à 12 mois :

Dans cette période le nourrisson ne peut pas fixer son regard et ne répond pas à son prénom.

Absence de babillage

Désintérêt aux personnes ou des objets.

### **I-2-2-Chez un bébé :**

12 à 24 mois :

Un retard ou absence de langage

Il préfère la solitude et ne répond pas ni par des gestes ni par les mimiques.

Après 24 mois :

Ne joue pas ni seul ni avec d'autres enfants, il essaye de parler mais pas dans le but de communiquer et aussi il répète ce que dit leur proches avec une inversions des pronoms (4).

### **I-2-3 Chez un enfant :**

L'enfant autiste ne peut pas interagir avec son environnement social. L'enfant autiste a une difficulté d'interagir avec son entourage il peut participer aux jeux (certains enfants ne peuvent pas participer aux jeux ou bien ils jouent en parallèle sans comprendre les règles de jeux,

Il ne répond pas quand on l'appelle.

Absence de langage, écholalie

Des comportements stéréotypiques (5).

Aggressivité contre soi ou contre les autres

Des crises d'angoisse et crier sans arrêt.

Routine et non acceptation de changement d'objets ou de situations.

Troubles alimentaires, troubles de sommeil, troubles sensoriels et psychologique (6).

### **I-3-Diagnostique :**

Le diagnostic de l'autisme est difficile à établir. Il est de nature clinique. Il n'y a pas des bio-marqueurs ou des tests prénataux disponibles. Il est basé sur des observations du comportement des enfants et leur développement selon l'âge et des entretiens avec les parents. Bien que certains puissent sonner l'alarme dans les premiers mois de vie, le diagnostic n'est pas fiable qu'à l'âge de 2 ans(7).

La notion de spectre autistique combine des tableaux cliniques distinctifs et des tableaux atypiques. D'une part en raison de la sévérité des symptômes ou de la variabilité de l'âge d'apparition d'autre part « association avec d'autre maladie comme le retard mental ou épilepsie. Ainsi au fil de temps, les manifestations de l'autiste varieront d'un enfant à l'autre.

Un spécialiste de l'autisme va se baser sur deux manuels pour établir son diagnostic : la **CIM-10** et le **DSM 5**. Les informations abordées dans ces deux ouvrages ont l'avantage de faire consensus au sein de la communauté scientifique internationale. Cependant, certaines notions diffèrent(8).

### **La CIM-10**

La Classification Internationale des Maladies, publiée par l'**OMS** (Organisation Mondiale de la Santé), fait office de **référence internationale**. Elle décrypte toutes les maladies connues, de la plus rare à la plus bénigne. Concernant l'autisme, la CIM-10 décrit les critères de chaque **TED** (troubles envahissants du développement) :

- l'autisme infantile;
- l'autisme atypique ;
- l'autisme dit de haut niveau (ex.syndrome d'Asperger) ;
- le syndrome de Rett ;
- le trouble désintégratif de l'enfance ;
- le TED non spécifiés.

Pour arriver à un diagnostic, la CIM-10 liste des critères par rapport à une **triade autistique** :

- **altération des interactions sociales réciproques** (difficultés à partager des émotions ou des intérêts, peu de contacts oculaires, etc.) ;
- **altération de la communication** (absence ou retard de langage, langage stéréotypé, écholalie, difficultés de conversation, etc.) ;
- **intérêts restreints et comportements stéréotypés** (mise en place de rituels, gestes stéréotypés, intérêts limités et d'intensité anormale, etc.).

Ces critères diagnostiques se réfèrent ici aux TED, dont il n'est plus question dans le DSM 5.



## Le DSM 5

Le DSM 5 référence différents types de maladies et de handicaps en listant leurs spécificités. La 5e édition du « Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders » (« Manuel diagnostic et statistique des troubles mentaux ») date de 2013.

L'autisme est dorénavant dans la catégorie des 3 troubles neuro-développementaux.

On ne parle plus de TED, du syndrome d'Asperger ou de Rett, mais plus généralement de **TSA, trouble du spectre de l'autisme**. Les critères diagnostiques aboutissent alors à **3 degrés de sévérité** des troubles détectés.

Le DSM 5 détaille et classe les critères d'évaluation selon une **dyade autistique** :

- **déficits de la communication et des interactions sociales** (réciprocité sociale et émotionnelle, comportements non verbaux, difficultés dans le développement des relations, etc.) ;
- **caractère restreint et répétitif des comportements et des intérêts** (gestes stéréotypés, intolérance aux changements, activités et intérêts restreints et anormaux dans leur intensité, hyper ou hypo sensibilité, etc.)(9).

Le diagnostic d'autisme doit être prudent car ce trouble est généralement lié à des pathologies telles que la surdité, la cécité, le retard mental, les défauts émotionnels la dépression de la petite enfance et le syndrome de l'X fragile et bien d'autre encore(10).

## **II-Autisme et immunité:**

Le fœtus est stérile lorsqu'il est dans le ventre de la mère, il se fait coloniser par des micro-organismes d'origine vaginale, orale ou cutanée provenant de celle-ci au moment de la naissance. Les bactéries sont très rapidement transmises à l'enfant lors de la manipulation fréquente du bébé et le processus de l'allaitement. Différentes bactéries colonisent le nourrisson en fonction du type de naissance, lors d'un accouchement classique (voie basse), les premières bactéries en contact avec le nouveau-né seront celles de la mère notamment de la flore cutanée et génitale. En revanche, lors d'un accouchement par césarienne, les premières bactéries en contact avec l'enfant viennent de l'environnement (matériel, air, équipe médicale), la contamination mère enfant est plus réduite(11).

Lors d'une naissance par voie naturelle, si l'accouchement est long, il est possible de retrouver le même sérotype d'*Escherichia coli* dans la bouche du nouveau-né et dans les échantillons fécaux de la mère, dû à la contamination mère enfant (1). En fonction de l'environnement et plus spécifiquement grâce à l'alimentation la flore va se diversifier dans les un à deux ans qui suivent. Dans les premières semaines, le rôle de l'alimentation lactée va permettre la colonisation par des bactéries comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, puis viendra le rôle de l'alimentation variée (2). Bien que l'enfant soit exposé à de nombreuses espèces bactériennes, toutes ne colonisent pas son tube digestif car différentes interactions bactérie-bactérie et bactérie-hôte interviennent dans l'établissement de la flore(12).

Les nouveau-nés ont dans leur environnement intestinal un potentiel oxydatif supérieur au pouvoir réducteur ce qui ne permet pas immédiatement le développement des bactéries anaérobies strictes. Le tractus intestinal est donc colonisé en premier par des bactéries aérobies-anaérobies facultatives composées d'entérocoques, de staphylocoques et d'entérobactéries (principalement *Escherichia coli*). Celles-ci atteignent rapidement des taux de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  UFC (unité formant colonie)/g de contenu colique, elles consomment de l'oxygène ce qui entraîne un changement 12 rendant le tractus intestinal en un milieu réducteur permettant l'implantation dans la première semaine de vie, des genres anaérobies stricts tels que *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et *Clostridium* (3). I.1.2 Répartition et composition A) Méthodes d'étude Le terme de microbiote est désormais utilisé, il est l'ensemble de

La flore intestinale, qui sert de stimulation antigénique permet le développement et la maturation du système immunitaire (exemple : chez l'enfant, la flore intestinale est peu ou pas développée, il en résulte alors un système immunitaire peu ou pas développé). La structure du Système Immunitaire lié à l'intestin est appelée : GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue = Tissu lymphoïde associé au tractus digestif). Le GALT est constitué : - De follicules lymphoïdes 19 - Des plaques de Peyer (en dessous de l'épithélium intestinal) - De cellules M « microfold », ayant un rôle dans le transport des antigènes bactériens vers les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg). Le GALT se développe grâce à la

flore intestinale. La microflore contribue à moduler la réponse immunitaire : Il en résulte la création d'un équilibre : (l'homéostasie intestinale) entre des réponses immunitaires faites par les bactéries de l'intestin (notamment des bactéries pathogènes) et le phénomène de tolérance vis à vis des bactéries commensales (= paradoxe fonctionnel) (13) .

Il a été aussi montré que Chez l'enfant autiste il y a une augmentation des cellules NK (40% par rapport aux enfants normal) avec ou sans déficience intellectuelle. Mais chez l'adulte autiste les pourcentages sont similaires à l'adulte sain. L'hyper activation anormale de NK. Qui produit une quantité importante des cytokines ce qui provoque une inflammation permanente cette dernière a des conséquences sur le système nerveux central. Cette anomalie permet la modulation de certains symptômes de l'autisme comme la conscience sociale, la structuration du langage (14).

Au cours de développement de nourrisson autiste on trouve une prédisposition génétique qui provoque une allergie alimentaire, cette allergie plus élevée par rapport aux enfants normaux. La réponse immunitaire adaptative chez un enfant autiste liée aux types des haplo types.

Haplo type classe 1 : ressemble aux troubles digestifs en particulier la maladie cœliaque. Il est responsable d'une réponse immunitaire contre les virus.

Haplo type classe 2 : Il est responsable sur la réponse anti infectieuse et d'inflammation, mais les personnes atteintes l'autisme n'ont pas ce haplo type, donc la réponse elle moins chez ces personnes .ce type a une réponse immunitaire contre les bactéries et les parasites.

Les gènes HLA sont responsables de la réponse aux infections. Chez une personne autiste il y a des bio marqueurs sur les gènes HLA et leur modification provoque une diminution de la réponse immunitaire. Donc diminution de la réponse anti infectieuse. Cette dernière, provoque des anomalies au système immunitaire c'est-à-dire une hypersensibilité auto-immunitaire dans laquelle on trouve des anticorps contre les bactéries, virus et aussi contre organe d'un autiste.

Les autistes ont des maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 et arthrite rhumatoïde.

Ce gène intervient dans le développement cérébrale et du cerveau. Leur modification provoque des anomalies au niveau de cerveau comme l'apprentissage. (15)

### **I-5-Autisme et infection :**

Certains virus connus pour endommager le cerveau des nourrissons sont soupçonnés de jouer un rôle dans le développement de l'autisme chez un petit nombre d'enfants.

Des études ont montré que la mère atteinte d'infection grave nécessite une hospitalisation pendant la grossesse courant un risque plus élevés d'avoir des enfants autistes.

La composition de population bactérienne dans le tube digestif de la mère peut influencer si l'infection de la mère Entraînera un comportement de type autistique chez les progénitures. Ils associé à ce modèle particulier de trouble neuro-développemental. (16)

La recherche prouve également que les facteurs environnementaux, tels que les virus, peuvent également jouer un rôle dans l'apparition de l'autisme. Les infections qui semblent être associé au développement de l'autisme comprennent la rougeole, la rubéole congénitale, le virus de l'herpès simplex, les oreillons, les varicelles, le cytomégalovirus et l'encéphalite causée par des virus invisible. Le virus de rubéole est la première cause connue de l'autisme. Plus tard, il a été découvert que les virus de la rougeole et des oreillons provoquent une encéphalite, qui à son tour conduit à l'autisme. L'infection affecte généralement le fœtus dans l'utérus de la mère. (17)

### **I-6-Autisme et infection fongique :**

Surnommé le "second cerveau", notre intestin participe activement à notre santé physique, mais aussi mentale. Avec ses 200 millions de neurones et six milliards des bactéries intestinales, notre tube digestif dialogue en permanence avec notre cerveau, et inversement. Mais cette communication peut être perturbée lorsque notre microbiote intestinal est altéré et qu'un processus inflammatoire s'installe.

Plusieurs études montrent des fortes présences de candida Albicans dans les intestins des enfants autistes. Or ce champignon produit de l'ammoniac et des toxines pouvant influencer le fonctionnement du cerveau et accentuer les désordres bactériens intestinaux. Chez l'animal, une alimentation maternelle riche en graisses serait associée à un déséquilibre du microbiote intestinal « dysbiose » et à la survenue de troubles autistiques chez la descendance. Les enfants nés par césarienne et ayant reçu de nombreux antibiotiques auraient, eux aussi, un risque plus important de développer ces troubles. Point positif en revanche : l'allaitement pendant les 6 premiers mois De vie (minimum) minimise chez le nourrisson le risque de développer ces troubles en grandissant.

Des études récentes montre que chez les enfants autistes et leur mamans les champignons sont présents même dans le sang sous une forme atypique (sans paroi cellulaire)(18).

## **I-7-Mycotoxine et autisme :**

Les mycotoxines provoquent de façon cruciale à la manifestation des troubles autistiques. Les mycotoxines sont un groupe de contaminants chimiques produits par des champignons omniprésents (principalement des genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*) sur une grande variété d'aliments dans des conditions spécifiques de température et d'humidité. Leur présence dans les aliments et dans le corps est préoccupante pour la santé humaine et animale, car l'exposition à ces toxines provoque des effets sur le système nerveux et sur le développement.

En général, certaines mycotoxines telles que l'ochratoxine A (OTA), les fumonisines (FB), la zéaralénone (ZEA), la gliotoxine (GLIO) et les aflatoxines (FA) peuvent provoquer une inhibition de l'immunité et un stress oxydatif. Plus précisément, certaines espèces d'*Aspergillus* produisent de l'OTA. Et *Penicillium*. C'est l'un des contaminants les plus abondants dans l'alimentation humaine et animale. L'OTA est néphrotoxique, hépatotoxique et cancérigène, et augmente la perméabilité intestinale, conduisant à la contrebande de grosses molécules à travers la paroi intestinale, ce qui va altérer sévèrement le système immunitaire et altérer l'axe dit « intestin-cerveau ». Cet axe est une diaphonie bidirectionnelle complexe entre l'intestin et le système nerveux central, agissant par l'intermédiaire de signaux neuroendocriniens et neuro-immuns. Les modifications de l'axe « intestin-cerveau » altèrent les fonctions neuropsychologiques et sont impliquées dans certaines affections psychiatriques, y compris l'autisme.

La consommation de FBs est un facteur de risque potentiel pour altérer le développement du tube neural par la perturbation de sphingolipide. Le ZEA et ses métabolites ( $\alpha$  et  $\beta$ -zearalenols,  $\alpha$  et  $\beta$ -ZEL) ont été détectés chez les fœtus de rats auxquels on a administré ce composé pendant la grossesse, ce qui confirme la présence et la transmissibilité de mycotoxines dans les fluides biologiques fœtaux-mères. Qui sont en corrélation avec la toxicose aiguë associée au retard de croissance, ont été détectés dans le sérum, l'urine et le liquide amniotique des femmes enceintes; l'exposition prénatale à 1,2 mg/kg de poids corporel sur 4 jours d'aflatoxine.

B1 (un contaminant mutagène et génotoxique classé dans le groupe I par le Centre international de recherche sur le cancer, CIRC) a entraîné un retard dans le développement de la réponse précoce, une coordination locomotrice altérée, et une capacité d'apprentissage réduite chez la progéniture de rats exposés à cette mycotoxine au milieu de la gestation<sup>9</sup>

Ainsi, étant donné que de nombreux symptômes neurologiques, inflammatoires et gastro-intestinaux, induits par l'exposition aux mycotoxines, sont semblables à ceux qui sont souvent associés au TSA comme comorbidités, on a postulé que les comorbidités du TSA (évalué par

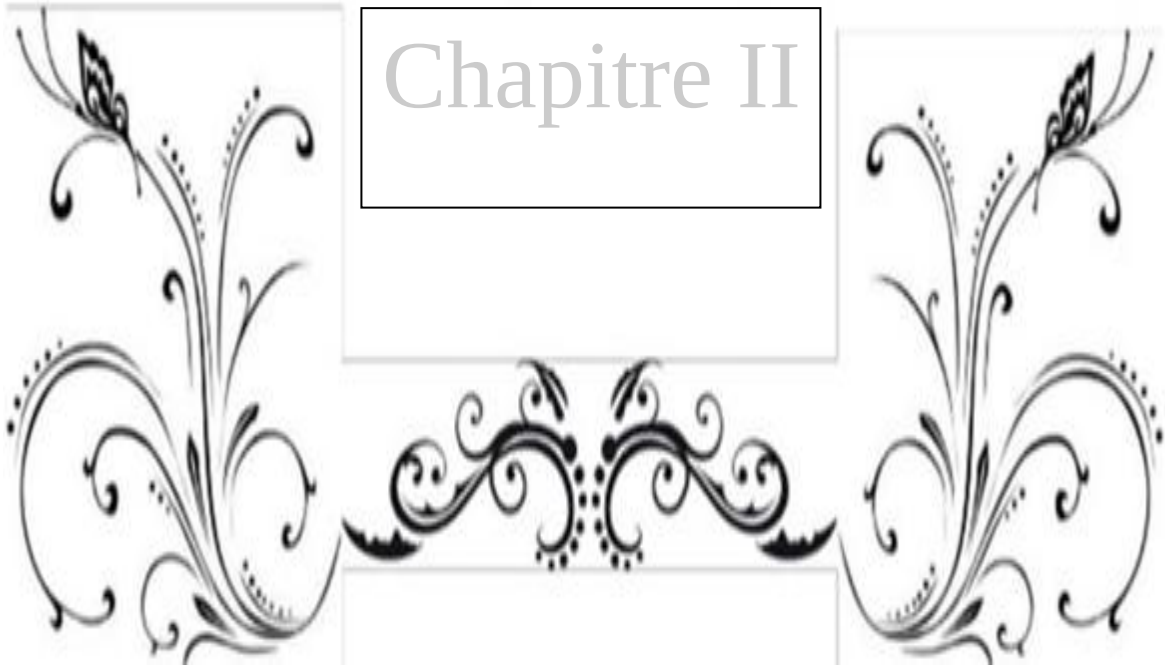
Certains paramètres cliniques comme la perméabilité intestinale, les marqueurs oxydatifs et d'inflammation) pourrait être aggravé par l'action toxique de ces contaminants. Les mycotoxines sont omniprésentes dans l'environnement et les enfants sont exposés par la nourriture ou des environnements pollués. Dans ce scénario, une relation causale entre les mycotoxines et la détérioration de la manifestation de l'autisme(19).

## **Objectif de la présente étude**

L'objectif de notre travail qui a été documenté dans ce mémoire été la recherche des infections par des levures et des moisissures de l'appareil urinaire chez des enfants autistes.

Les infections ont été analysées par des simples cultures dans le but de chercher des corrélations entre la présence de ces infections et la sévérité de certains comportements autistiques.

## Chapitre II



## **II- Chapitre II Matériel et méthode**

### **.II-1-1- Cadre de l'étude**

Notre stage à été effectuée au sein de laboratoire de microbiologie d'un laboratoire privé AMANELAB dans une période de 35 jours.

### **.II-1-2- Population d'étude**

La population étudiée se compose de 12 enfants diagnostiqués comme autistiques scolarisés dans des centres spécialisés et 12 enfants normaux.

### **II-1-3- Recueil des urines**

Le recueil des urines se fait selon la technique « clean catch urine». Le sujet fait un lavage hygiénique par un savon suivit par un bon rinçage.il élimine le premier jet environ 20ml d'urine qui est contaminé par la flore commensale puis il recueille le tube à urine stérile.

### **II-1-4-Transport et congélation d'urine :**

Les urines ont été acheminées au laboratoire rapidement en mois 2heures. Puis conservé au frigo à 4°C.



## **II-2Matériel et méthode :**

### **II-2-1- Matériel :**

#### **II-2-1-1-Matériel utilisé :**



Figure 1 : tube à essai



figuré 2 : biote de pétri



Figure 3 : lame

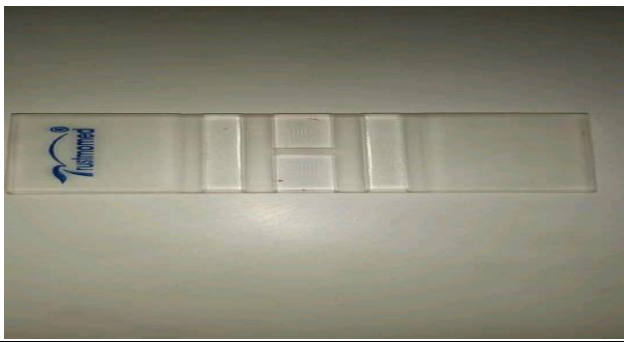


Figure 4 : cellule de mallasse



Figure 5 : microscope optique



Figure 6 : étuve



Figure 7 : pipette pasteur



Figure 8 : Bec bunsen



Figure 9 : micropipette



Figure 10 : microonde



Figure 21 : autoclave



Figure 12 : balance



Figure 13 : Une centrifugeuse



Figure 14 : bécher et fiole



Figure 15: eau distillés

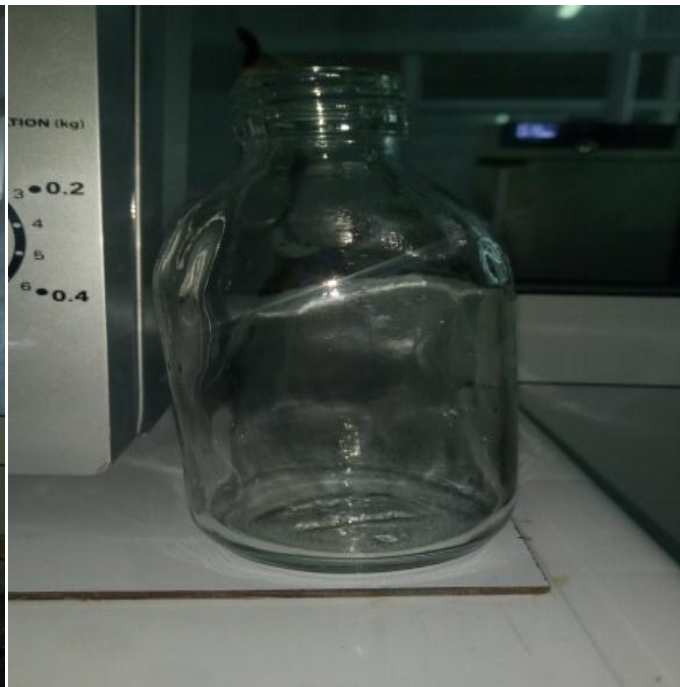


Figure 16 : les bouteilles stériles

## II-2-1-2-Milieu et produit utilisé :

### II-2-1-2-1-Gélose sabouraud chloramphénicol agar :

- La gélose sabouraud est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de levures et moisissures. L'addition de chloramphénicol inhibe la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif.

#### ➤ **Formule :**

- Ingrédients grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisé.

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Peptone de caséine  | 5,00  |
| Peptone de viande   | 5,00  |
| Glucose monohydrate | 40,00 |
| Chloramphénicol     | 0,50  |
| Agar                | 15,00 |

PH final à 25 C° : 5,6

#### ➤ **Préparation**

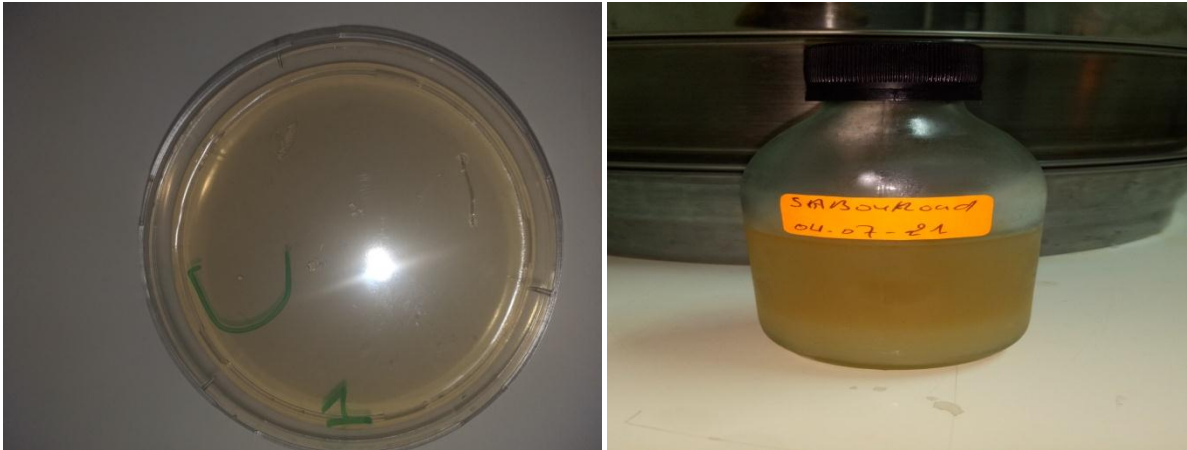
1. Mettre en suspension 65,5 gramme dans 1 litre d'eau pure.
2. Porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1 minute.
3. Répartition en tube ou flacons.
4. Autoclave à 115 C°

#### ➤ **Conservation :**

- Flacons et tube : 6 mois à 15- 25 C° la date d'expiration indique sur l'emballage.
- Boîte : 1 mois à 2- 8 C° la date d'expiration indique sur l'emballage.
- Milieu déshydraté : 2 à 30 C° la date d'expiration indique sur l'emballage.

➤ **Incubation :**

1. Pendants 3 à 5 jours à 20-25°C



Milieu SABOREAU CHLOROMPHENICOLE

II-2-1-2-2-Le gélose PCA (plate count agar)

La gélose PCA (plate count agar) est un milieu recommandé pour le dénombrement standardisé des bactéries dans l'eau, les produit laitière et les aliments, les produit cosmétique ou pharmaceutique.

➤ **Formule :**

2. Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisé.

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Peptone de caséine  | 5,00  |
| Extraits de levures | 2,50  |
| Glucose             | 1,00  |
| Agar                | 15,00 |

-PH final à 25°C : 7,00

➤ **Conservation :**

Ce milieu en tubes ou flacons entre 2-25°C. Le milieu en boites se conserve entre 2 et 8°C .



➤ **Préparation :**

- Mettre en suspension 23 grammes dans 1 litre d'eau pure. Porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant ou moins -1 minute.
- Répartition en tube ou flacons.
- Autoclave à 121°C pendant 15 minute.

➤ **Utilisation :**

- Introduire dans des boites de pétri stérile, 1 ml du produit à examiner ou de ces dilutions décimales.
- Ajouter dans les 15 minutes, dans chaque boites, 15 ml de gélose PCA pour dénombrement à liquifié à 45°C mélanges soigneusement et laisser solidifier.

➤ **Incubation :**

- Pendant 24-72heures à 30°C.
- Compter les colonies sur les biotes comportant entre 10 et 300 colonies.
- 

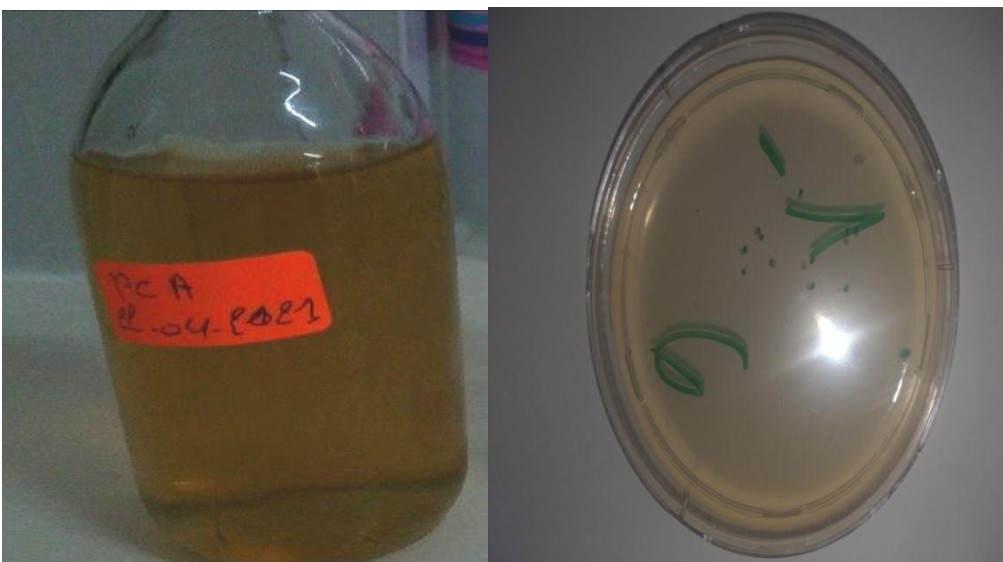


Figure 18 : milieu de culture PCA.

### II-2-1-2-3-TRYPTONE SEL EAU (TSE) :

- Le milieu TRYPTONE SEL (ou peptone sel) est un diluant isotonique faiblement peptone utilisé pour les dilutions dans les analyses de denrées alimentaires ou cosmétique.

#### ➤ **Formule :**

- Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisé.

-

TRYPTONE (peptone de caséine) 1,00

Chlorure de sodium 8,50

PH final à 25°C : 7,00

#### ➤ **Conservation :**

- Tube ou flacons : 2-25°C.
- Milieu déshydratés : 2-30°C

#### ➤ **Préparation :**

- 1) Dissoudre 9,5 grammes dans 1 litre d'eau pure.
- 2) Si nécessaire, chauffer sous agitation fréquente pour dissoudre complètement la suspension.
- 3) Répartir en tube ou flacons.
- 4) Autoclave 15 minute à 121°C.



Figure 19: TRYPTONE SEL EAU.

## II-2-2- Méthode

La qualité des urines a été testée par une étude macroscopique, une étude microscopique, et des cultures sur milieux solide.

### II-2-2-1-Etude macroscopique :

L'étude macroscopique de l'urine homogénéisée consiste à observer à l'œil nu la présence ou l'absence des modifications des caractères physiques de l'urine (couleur, limpidité, odeur, poids, volume.). Et dépôt cristallin (pus) ou de sang.

-les différents aspects des urines

=jaune citrin clair

=jaune citrin légèrement trouble

=jaune citrin trouble

=jaune paille légèrement trouble

=hombre trouble

=hématurie légèrement trouble

=présence des sédiments (20)



Urine clair



Pyurie



Urine trouble

Figure 20: Macroscopie des urines (21)



### **II-2-2-2-Examen cytotabériologique des urines (ECBU) :**

L'examen cytotabériologique des urines (EBCU) constitue l'élément de certitude de l'infection urinaire (UI). Il a pour but de révéler la présence de germes responsable de cette infection. Pour obtenir des bons résultats, il est important de respecter les conditions de recueil, de conservation et de transport (22)

### **II-2-2-3-Examen microscopique (cytologies) ;**

L'examen microscopique des urines est un examen direct qui permet de dénombrer les éléments cellulaires (aspect quantitatif) dans un hématimètre (ou cellule de malassez). Auparavant, les urines ont été homogénéisées, ensuite à l'aide d'une pipette pasteur stérile, on dépose quelques gouttes d'urines entre la lame et la lamelle, suivie d'une observation au microscope optique à l'objectif (40X). L'hématimètre permet de dénombrer des différents éléments (leucocytes, hématies, cellules épithéliales, cristaux, levures, flore bactérienne etc.) Contenus dans volume donné d'urine. Les résultats sont exprimés par mm<sup>3</sup>.

### **II-2-2-4-Cellule de malassez :**

La cellule de malassez est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellule en suspension dans une solution, il s'agit d'une cellule dans le volume mesure 1mm. Elle compte 5 bandes horizontales de 4 ligne chacune et 5 bande verticales de 5 lignes chacune.

### **II-2-2-5-Examen bactériologique**

#### **II-2-2-5-1-*Isolement sur milieu PCA***

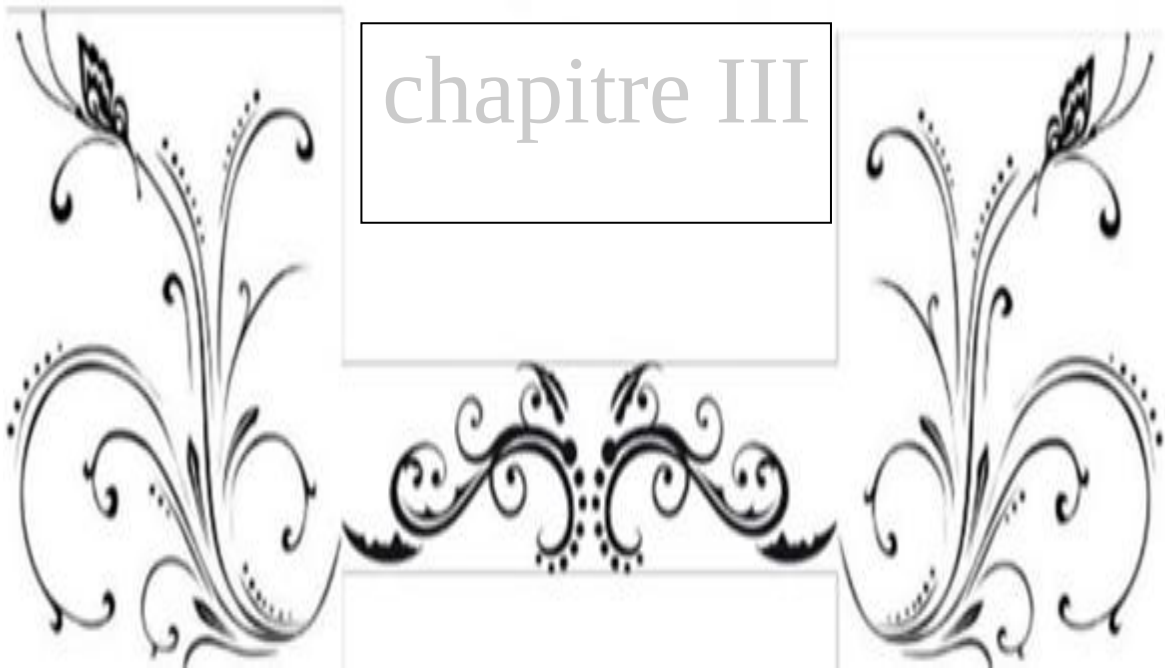
##### ***La dilution d'urine :***

- Dilution de 1/10
  - 1 ml d'urine mélangée est dilué dans 9ml de tryptone sel à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans 24 tubes essai (12 enfants autiste et 12 enfants normale). 1ml de cette dilution est ensuite aussitôt étalé sur boîte pétri qui contient le PCA avec un râteau stérilisé.
- Dilution de 1/100
  - Une double dilution de l'urine est effectuée en prend 1ml de premier dilution (1/10) et en met dans le TSE (9ml) dans 24 tubes à essai. 1ml de cette dilution est ensuite aussitôt étalé sur boîte pétri qui contient le PCA avec un râteau stérilisé.
  - Laisser solidifié puis incubé 48-72 heures à 30°C.

#### **II-2-2-5-2-*Isolement sur milieu sabouraud chlormomphenicol :***

1. Centrifuger 10 ml de l'urine dans les tubes à centrifugations pendant 10 minutes pour les 24 échantillons.
2. Retirez le surnageant environ 1 à 2 ml de culot de cellules, en faisant attention de ne pas perturber le culot.
3. 1ml de culot est ensuite étalé sur la boîte de pétri.
4. Laisser solidifié puis incubé 3 à 5 jours à 25°C.

# chapitre III



**III-1-Résultat**

III-1-1-Résultat Selon l’aspect :

|                    | Enfants autiste |           | Enfants normal |           |
|--------------------|-----------------|-----------|----------------|-----------|
|                    | Effectif        | Fréquence | Effectif       | Fréquence |
| Clair              | 11              | 91,67%    | 11             | 91,67%    |
| Légèrement trouble | 0               | 0%        | 1              | 8,33%     |
| Trouble            | 1               | 8,33%     | 0              | 0%        |

Tableau 1 : Répartition des résultats de l’étude macroscopique selon l’aspect

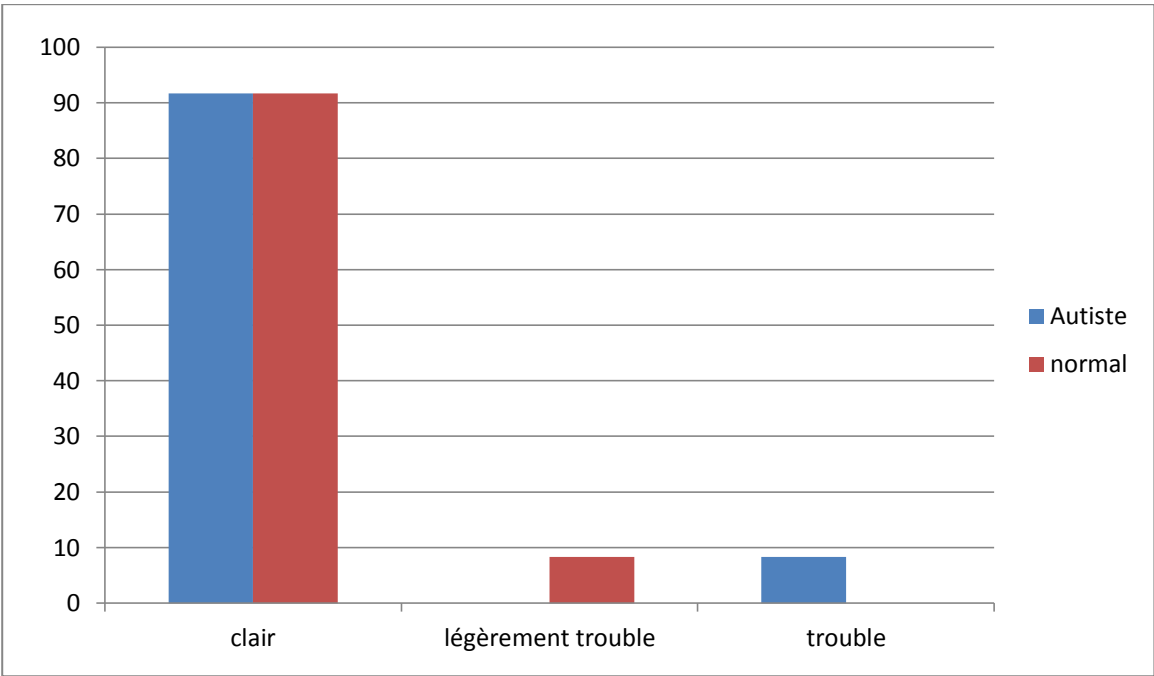


Figure 21: Répartition des résultats de l’étude macroscopique selon l’aspect

### III-1-2-Répartition des résultats de l'étude macroscopique selon la couleur

:

|             | Enfant autiste |           | Enfant normal |           |
|-------------|----------------|-----------|---------------|-----------|
|             | Effectif       | Fréquence | Effectif      | Fréquence |
| Jaune clair | 8              | 66,67%    | 9             | 58,33 %   |
| Jaune pale  | 2              | 16,67%    | 2             | 16,67 %   |
| Marron      | 2              | 16,67%    | 1             | 8,33 %    |

Tableau 2 : Répartition des résultats de l'étude macroscopique selon la couleur

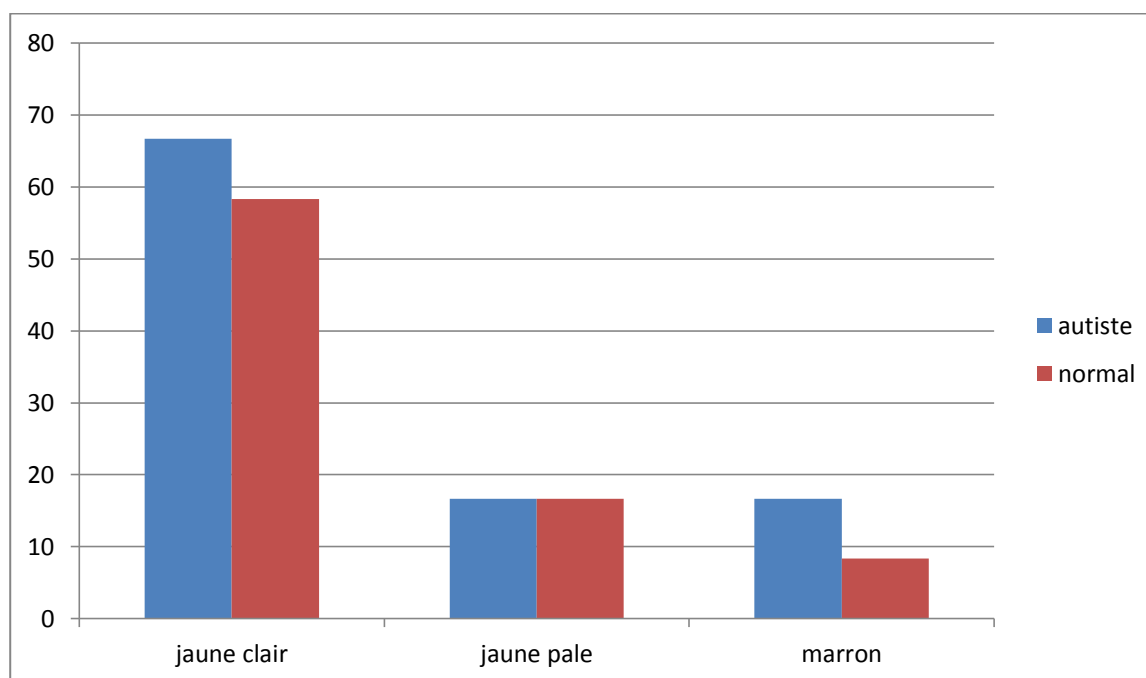


Figure 22 : Répartition des résultats de l'étude macroscopique selon la couleur

### III-1-3-Résultats de l'examen bactériologique :

Bactérie sur PCA

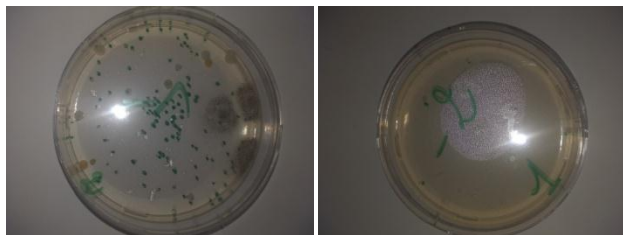


Figure 23 :Résultats positif Figure 24: résultat négatif

Sur pca

sur pca

Champignons sur Saboroud chlormphenicole

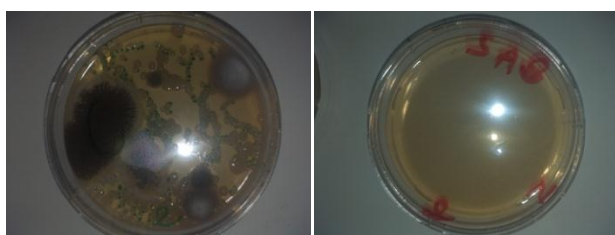


Figure 25 :Résultat positif

Figure 26 :résultat négatif

| <b>Enfants autistes</b>      | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Colonies Bactériennes UFC/ml | 1630     | 1290     | 3000     | 360      | 50       | 2540     | 1700     | 1190     | 2260     | 1450      | 60        | 80        |
| Levures UFC/ 10 ml           | 10       | 265      | 101      | 0        | 300      | 0        | 7        | 0        | 2        | 0         | 1         | 0         |
| Moisissures UFC/ 10 ml       | 0        | 4        | 0        | 0        | 1        | 0        | 3        | 0        | 1        | 0         | 4         | 0         |
| <b>Enfants normaux</b>       | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> |
| Colonies Bactériennes UFC/ml | 2100     | 1870     | 0        | 2340     | 90       | 120      | 20       | 2600     | 27       | 0         | 0         | 0         |
| Levures UFC/ 10 ml           | 84       | 0        | 0        | 1        | 1        | 2        | 0        | 198      | 0        | 0         | 0         | 0         |
| Moisissures UFC/ 10 ml       | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0         | 0         | 0         |

Tableau 3 : résultat d'examen microbiologique

### III-1-4-Résultatde l'examen microscopique sur cellulemallassiez:

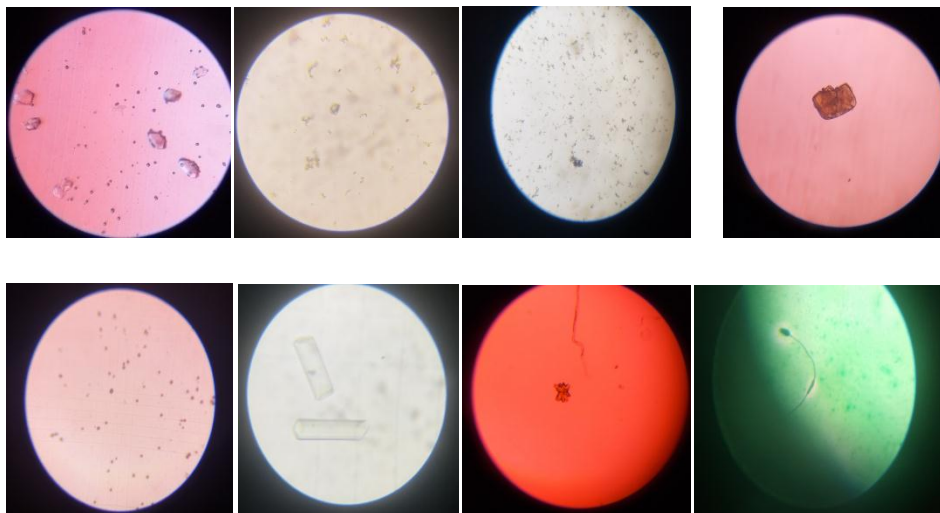


Figure 28 : résultat des leucocytes et cristaux sur microscope optique (grossissement \* 40)

| Enfants      | 1     | 2      | 3      | 4     | 5     | 6      | 7     | 8     | 9     |
|--------------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| Démembrement | 30000 | 80000  | 110000 | 80000 | 60000 | 150000 | 20000 | 50000 | 90000 |
| Enfants      | 10    | 11     | 12     | 13    | 14    | 15     | 16    | 17    | 18    |
| Démembrement | 20000 | 40000  | 20000  | 50000 | 10000 | 10000  | 20000 | 30000 | 40000 |
| Enfants      | 19    | 20     | 21     | 22    | 23    | 24     |       |       |       |
| Démembrement | 20000 | 190000 | 240000 | 30000 | 50000 | 70000  |       |       |       |

Tableau 4 : réparation des résultats microscopique

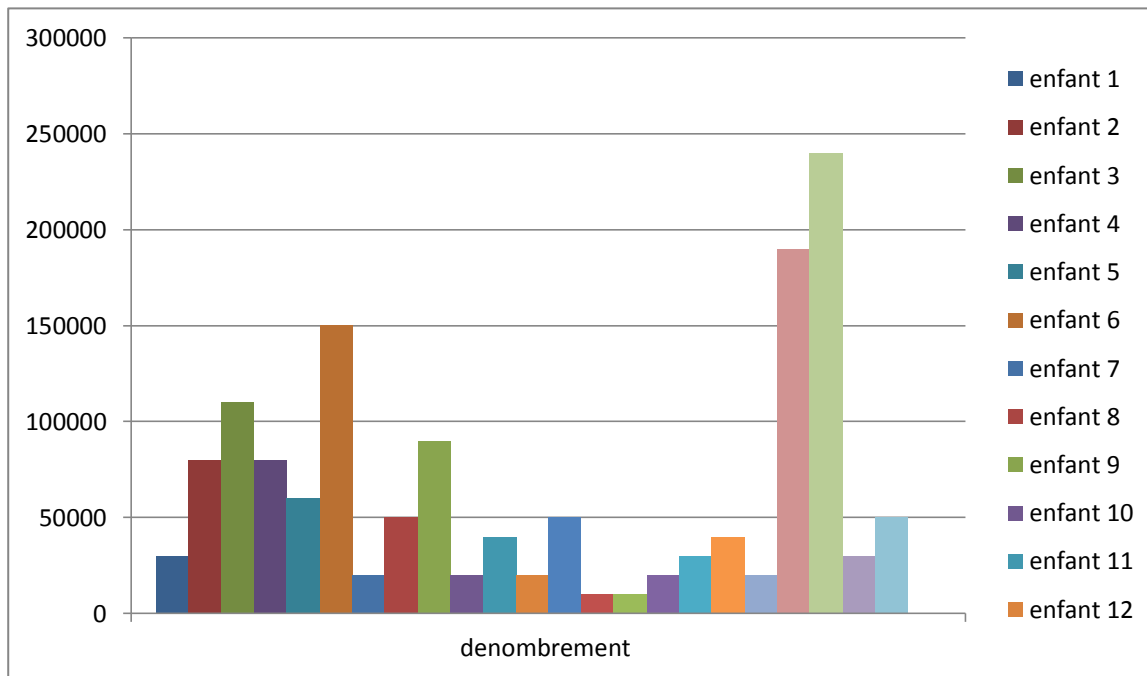


Figure 29 :Répartition des résultats de la cellule malassez

### **III-2-Discussion :**

#### III-2-1-Analyse de l'aspect d'urine :

D'après analyse macroscopique des échantillons étudié, nous constaté trois aspect macroscopique :

- clair
- légèrement trouble
- trouble

Aspect clair : Enfant n'aucune infection urinaire.

Aspect trouble : c'est une infection urinaire qui touche les reins ou vessie, si on a des pus ou sang on parle de médecine de la pyurie.

Cette infection du a la consommation excessive de phosphate qui est dans les produits laitiers (fromage) et des produits d'origines animale (poissons, viande rouge), ces aliments provoque une précipitation de cristaux d'oxalate de calcium.

Remarque :

- le caractère trouble de l'urine n'est pas forcément le signe d'infection, il peut avoir l'existence des cristaux (hématurie). (32)



### III-2-2-Analyse de la couleur d'urine :

On a trouvé trois couleurs : jaune pale et jaune foncé et marron

La couleur jaune pale qui on trouvé c'est la couleur de bonne santé, ou une hydratation ; la personne boit beaucoup de liquide (eau)

La couleur jaune foncé : destruction des globules rouges par une série de transformation et réaction chimique dans la fois qui permet de donné le pigment jaune.

La couleur marron : due à la présence d'un excès de leucocyte, cristaux, sels d'acide urique, acide phosphorique, hémoglobine ou des métabolites.

-la coloration de l'urine n'est pas un critère de l'hématurie.il peut être une prise d'un médicament (comme rifampicine). (33)

### III-2-3-Analyse des résultats de l'infection urinaire :

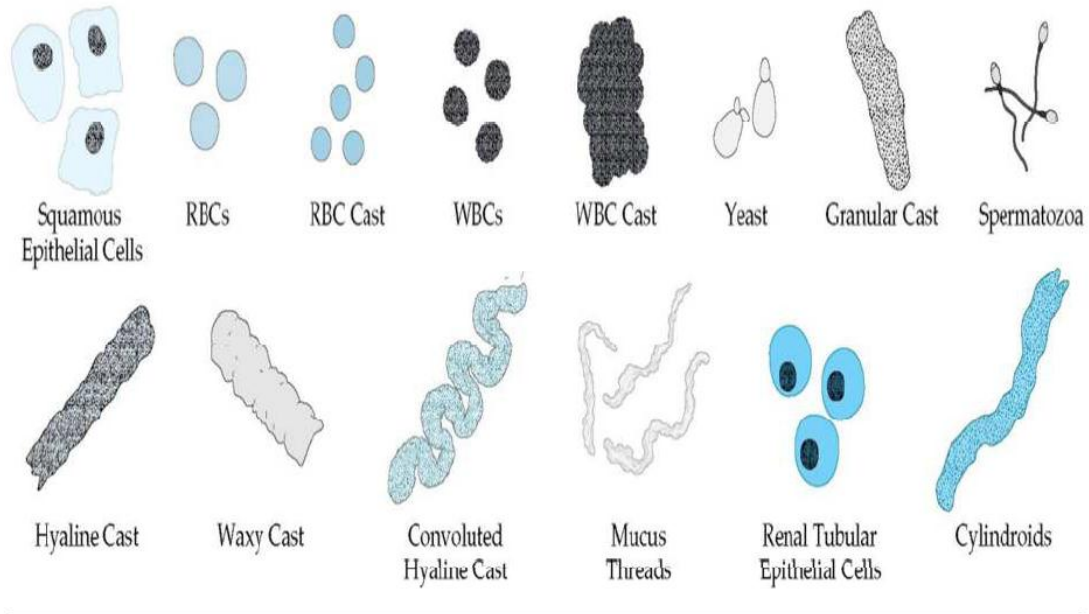
On trouvé 8 enfants autiste on une infection urinaire par une valeur varie entre 10000 UFC/ml et 30000 UFC/ml, et 4 enfants normal on une valeur de 10000 UFC/ml et 26000 UFC/ml.

La présence des bactéries dans les urines des enfants autiste due à la colonisation qui ce trouve dans leur intestin, la présence des certaines bactéries permettent une inflammation chronique ce Qu'il exprime la libération des mycotoxines dans les urines. Par contre chez les enfants normaux on avait plus des mycotoxines.

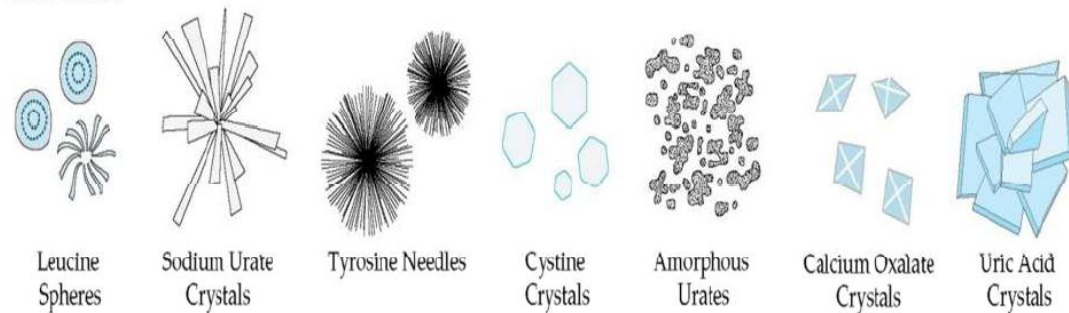
Pour les enfants autistes et leurs mères, une conclusion commune est qu'une variante sans paroi du cycle de vie d'*Aspergillus fumigatus* existe dans le sang.la CWD est transformée en bactérie et champignons détectables dans des conditions de culture appropriées. On peut supposer que les enfants autistes peuvent naitre avec une colonisation fongique obtenue de la mère à travers le placenta. « L'Aspergillose silencieuse » affectera fortement le développement du système immunitaire et nerveux pendant la petite enfance. Et est la principale cause des troublesneurodéveloppementaux.

### III-2-4-Analyse microscopique

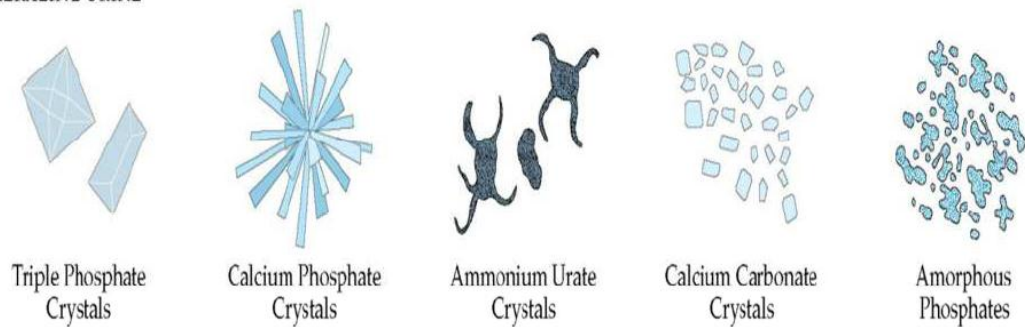
#### NORMAL URINE



#### ACID URINE



#### ALKALINE URINE



**Figure 30:** Schéma présente le sédiment urinaire

Chez les enfants normaux on a trouvé la présence des mucus threads qui signifie une urine normale. Mais il y a d'autres enfants qui ont trouvé des cristaux de calcium oxalate Crystal qui signifie une urine acide, ces enfants souffrent d'une infection urinaire.

Chez les enfants autistes on a trouvé soit urine acide ou urine alcaline :

On a trouvé des calciums carbonate Crystal, amorphes phosphates et acide urique Crystal qui signifie une urine acide.

Urine alcaline, on a trouvé un triple phosphate.

Ces résultats peuvent indiquer une infection urinaire. Mais chez les enfants autistes peut-être n'est pas un signe d'infection parce qu'il existe des cristaux et métaux lourds dans leur système urinaire.

On a trouvé des spermatozoïdes chez un enfant autiste, dans ce cas on parle de l'autisme d'origine génétique. Leur père a une déformation au niveau des spermatozoïdes qui transmet aux enfants avec autisme.

Il existe des leucocytoses et des hématies dans les urines des enfants normaux plus fréquentes que les urines des enfants autistes grâce au désordre du système immunitaire, qui diminue l'existence des globules blancs et rouges.

## **Conclusion :**

A partir du résultat obtenu il en ressort que chez les enfants la « colonisation fongique » ou « infection fongique » est la maladie principale de la petite enfance, qui affecte fortement le développement des systèmes immunitaires et nerveux. Les champignons persistants maintiennent l'activité métabolique et peuvent produire des mycotoxines qui à un rôle possible de déclenchement de symptôme de l'autisme et d'autres sous-produits. Les métabolites fongiques se trouvent généralement dans l'urine des enfants autistes et peuvent être utilisés comme marqueur de la présence de champignons. Les sous-produits du métabolisme des moisissures ont des effets négatifs sur l'intégrité structurelle ou fonctionnelle du système nerveux en développement et être la cause majeure de trouble neurodéveloppementaux.

# Liste de références

[1] – Lefebvre Julie 2015 Existe-t-il un lien entre l'autisme et la flore intestinale ?

[2] – organisation mondiale de la santé

[3] – the valproate model of autism

[4] – les signes dun trouble du spectre de lautisme (tsa) chez le nourrisson et enfant de 6 à 4 mois

[5] – [https :vaincre lautisme .org /comprendre](https://vaincrelautisme.org/comprendre)

[6] – nicoletta leclotta-rachel charbonniez cycle de conférences louhans 6 juillet 2015

[7] – vaincre lautisme org association

[8] – Biographie site internet

[9] – Biographie site internet

[10] – mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'assistante sociale de l'université de la Méditerranée

1950 soin caron l'oriame

[11] – Bibliographie mémoire

[12] – Bibliographie mémoire

[13] – Bibliographie mémoire

[14] – la piste immunologique est fortement suspectée dans la survenue des troubles du spectre de l'autisme

[https :www ;fon dation-fondamental.org](https://www.fondation-fondamental.org) publié 30 août 2019

[14] – quand l'immunité s'invite dans l'autisme et les troubles bipolaires publié : 05 juin 2018

[14] – -anne trafton ;bureau de presse attpi ;news mitiedu 2017

[14] – -attp :news ; médical net dr ananya nandal md

[14] – Bibliographie

[14] – Bibliographie

[14] – Roubaud-baudron C,gavazz.G.2014

[14] – Janviera, F. Mbongo-kamaa,E.Merensa,A. Cavallo, J-D.(2008).Les Difficultés D'interprétation de l'Examen Cytobactériologique des Urines ;

[14] – Bouakkaz, H.Boucherbit, S.L'Examen Cytobactériologique des Urines Chez l'adulte ; Mémoire de Fin d'étude ; Université des Frères Mentouri Constantine ; 18 p.

[14] – MR.ILYASS ES-SAUDY ,2019 thèse :profil bactériologique des infections urinaires à l'hôpital militaire AVICENNE de marrakech

[14] – ait miloud,2011

## Résumé :

L'autisme est un trouble envahissant du développement (TED) qui apparaît précocement au cours de l'enfance et persiste à l'âge adulte. Il se manifeste par des altérations dans la capacité à établir des interactions sociales et à communiquer, ainsi que par des troubles du comportement. Le diagnostic de l'autisme est difficile à établir. Les causes de cette maladie sont multifactorielles : génétiques, environnementales et immunitaires. Dans cette étude, l'efficacité du système immunitaire des enfants autistes a été analysée par la recherche des infections silencieuses dans le système urinaire par des champignons. Les urines collectées de 12 enfants autistes et 12 enfants normaux ont été analysées par des examens macroscopiques et microscopiques. Les résultats confirment que les enfants autistes souffrent des infections urinaires sans présenter les symptômes habituels.