

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie*

Mémoire de fin d'étude

*En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière : Science Biologiques
Option : Microbiologie*

Thème

**Isolement et identification de quelque
microorganismes de la flore buccale chez les sujets
cancéreux**

Présenté par : Benhafri Meroua

Soutenu le : 18/09/2022

Devant le jury :

Nom	Grade/Lieu	Qualité
Mr GUEDIOURA A.	MCA /USDB1	Présidente
Mme BOUDJEMA N.	MCA/USDB1	Examinatrice
Mme EDDAIKRA A.	MCB/USDB1	Promotrice
Mme DEBIB A.	MCA/CU TIPAZA	Co-promotrice

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Ce modeste travail est le fruit des efforts et des sacrifices consentis par les enseignants de l'université qui ont su guider nos pas dans la voie de la recherche et de la connaissance. Nous prions Allah qu'il récompense ces nobles enseignants

*Je remercie en particulier ma promotrice Dr « **EDDAIKRA A.** », maitre de conférences classe « B », et ma Co-promotrice Dr « **DEBIB A.** » maitre de conférences classe « A » pour leurs précieux conseils, leur compréhension et leur disponibilité pour l'aboutissement de ce travail*

*Je tiens à remercier aussi Dr « **GUEDIOURA A.** », maitre de conférences classe « A » de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury*

*Je tiens à exprimer mes remerciements et ma très grande considération à Dr « **BOUDJEMA N.** », maitre de conférences classe « A » d'avoir accepté d'examiner ce travail*

*Je tiens à exprimer mes remerciements et ma très grande considération au Dr **Betatache Ilaam** et Mme **Benabdelkader Chafika** de l'institut pasteur d'Algérie*

Sans oublier ceux qui ont participé de près ou de loin à réaliser ce projet

De fin d'étude.

Dédicace

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation et de ses dévouements

A ma chère Mère

A celui qui s'est changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions

A mon cher Père

A ma petite famille qui m'a toujours soutenue

A tous mes collègues et amis

Je dédie ce modeste travail

MEROUA

Résumé

Notre travail porte sur l'isolement et l'identification de quelques microorganismes de la flore buccale chez les sujets cancéreux et plus précisément le cancer du sein.

Sur deux (2) prélèvements salivaires des sujets cancéreux effectués dans le service centre anti cancer (CHU de France Fanon de Blida), nous avons noté une prédominance des bactéries présentant une forme Cocci à Gram positif (+) du genre *Streptococcus* accompagné d'un faible rapport des bactéries bacillaire et coccobacille de Gram négatif du genre *Prevotella* et *Klebsiella* ayant des proportions proches.

De plus, cinq (5) prélèvements de la salive des sujets sains, ont montré également une prédominance des bactéries de type aérobie du genre *Streptococcus* et une présence moyenne des bactéries caractérisées par une forme Cocci de Gram +, du genre *Staphylococcus* et *Micrococcus*

Mots clés : Salive, Cancer, aérobies, staphylococcus, *Streptococcus*, *Micrococcus*, Gram+.

Liste des abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
THS: Thyroid Stimulating Hormone
GRS : Score de risque génétique de cancer du sein
RE : Récepteur des œstrogènes
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
PR : Progesterone receptor
GES : Signature d'expression génique
ERBB2: Receptor tyrosine kinase 2
TNBC: *Triple-negative breast cancer*
TNF α : Tumor Necrosis Factor
TME: Tumor microenvironment
CD: Cellules dendritiques
MDSC: Cellules myéloïdes suppressives et cancer
IgA: Immunoglobuline classe A
BHIB : Bouillon cœur cervelle
VP: Voges-Proskauer
HIP: Acide hypurique
PYRA : Acide pyroglutamique
BGUR : Bêta-glucuronidase
BGAL : β -galactosidase
PAL : Phosphatases alcalines
LAP : Leucine aminopeptidase
CIT : Citrate de simmons
ADH : Arginine dihydrolase
LDC : Lysine décarboxylase
ODC : Ornithine décarboxylase
H₂S : Hydrogen sulfide

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Schéma de l'influence microbienne sur le cancer du sein	
2	Facteurs intrinsèques et extrinsèques affectant la composition et homéostasie du microbiome orale	
3	Composition du microbiote salivaire chez différents taxons. Diagramme à barres montrant la composition bactérienne moyenne des différents taxons de (A) l'embranchement et (B) du genre dans chaque groupe	
4	Les principaux groupes bactériens associés à la cavité buccale.	
5	Organigramme du plan expérimental	
6	Protocole expérimental de mise en culture et incubation	
7	Protocole de la coloration de Gram	
8	Lecture des galeries	
9	Aspect macroscopique des colonies obtenues	
10	Aspect microscopiques des genres obtenus, 1, 2 et 3 chez les patients témoins , 3 chez le patient cancéreux	

Liste des figures

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) des streptocoques identifiés	
Tableau II	Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de <i>Prevotella sp</i>	
Tableau III	Résultats des tests biochimiques (Api 20E) de <i>K. pneumoniae</i>	
Tableau IV	Nombres des espèces bactériennes isolées à partir des sujets cancéreux et des sujets témoins	

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Chapitre1 : Généralités

1	Cancer du sein	16
1.1	Dépistage	16
1.2	Abcès mammaires	16
1.3	Types	16
1.4	Agent causal	16
1.5	Les facteurs de risque	17
1.6	Classification des tumeurs	18
1.7	Mécanisme d'initiation	18
1.8	Evolution du cancer du sein	18
1.9	Mécanismes bactérien pour ciblage et suppression des tumeurs	19
	Ciblage tumoral de <i>Listeria spp</i>	19
1.10	Cavité buccale	20
	Microbiome buccale	20
	Maladies buccales	21
	Microbiote oral	21
1.11	Liquide biologique (salive)	21
1.12	Rôle	22
1.13	Composition	22
	Matériel et Méthodes	17
1.14	Matériel	17
	Matériel biologique	17
	Matériel non biologiques	17
1.15	METHODES	18
	Prélèvement	18
	Méthode expérimentale	20

Sommaire

❖	Galerie Api Strep.....	25
2	3. RESULTATS.....	37
	3.1 Résultats de l'examen macroscopique et microscopique des prélèvements.....	37
○	La coloration de Gram	38
○	Les genres identifiés	39
	<i>Streptococcus</i>	39
	<i>Staphylococcus sp et Micrococcus sp</i>	39
	<i>Prevotella sp.</i>	39
	<i>Klebseilla</i>	40
3	Tableau IV : Nombres des espèces bactériennes isolées à partir des sujets cancéreux et des sujets témoins.....	40
4	Discussion.....	41

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

La cavité buccale est un habitat riche et diversifié de bactéries et autres microorganismes. Les études montrent qu'un déséquilibre de la flore buccale peut conduire à des maladies bucco-dentaires, ainsi qu'à des cancers et autres maladies systémiques. Avec plus de 10 000 espèces présentes, les scientifiques ont commencé à démêler les interactions complexes entre les microorganismes et le corps humain (**Zhang *et al.*, 2014**). L'utilisation des méthodes bactériologiques conventionnelles (culture bactérienne) et moléculaires modernes tel que le séquençage du génome bactérien ont confirmé des associations entre des bactéries spécifiques ou d'autres microorganismes et certains cancers (**Kilian *et al.*, 2016 ; Giordano-Kelhoffer *et al.*, 2022**).

Plusieurs études se sont basées sur la comparaison des échantillons de personnes malades à ceux témoins, afin de détecter les variations d'espèces du microbiote. (**Zhang *et al.*, 2014**).

Le cancer du sein est la forme la plus commune de cancer et la première cause de décès par cancer chez les femmes. Environ 685 000 femmes sont mortes du cancer du sein en 2020. Plus de 2,2 millions de cas de cancer du sein ont été recensés en 2020, ce qui en fait le cancer le plus courant. Près d'une femme sur 12 développe un cancer du sein dans sa vie (**OMS, 2021**).

La plupart des cancers du sein sont diagnostiqués à un stade tardif, entraînant des taux de mortalité élevés. La mammographie de dépistage traditionnel est considérée comme le diagnostic de référence du cancer du sein, mais la sensibilité de cet examen est variable selon le type de mammographie (**OMS, 2021**).

L'objectif principal de cette étude est l'isolement et l'identification des microorganismes de la flore buccale chez des sujets cancéreux et les comparer avec ceux isolés des sujets témoins sains. Afin d'atteindre cet objectif nous avons suivi les étapes suivantes

1. Isoler les bactéries à partir des échantillons salivaires (Témoin / cancéreux).
2. Cultiver les agents bactériens sur des milieux ordinaires et spécifiques.
3. Caractérisation des genres les plus dominants par une identification biochimique (Galerie classique + les Galerie API)
4. Détermination de la fréquence des souches aérobies et des souches anaérobies.

Chapitre 1 : Généralités

Le cancer est principalement causé par une altération génétique qui entraîne la dérégulation des réseaux de gènes responsables du maintien de l'homéostasie cellulaire, résultant des interactions de la somatique et des mutations germinales avec divers facteurs environnementaux. (Centre for Molecular Médecine and Biobanking, University of Malta, 2020)

Il y a plus de 100 types de cancer, classés selon le tissu d'origine. Par conséquent, les symptômes du cancer varient considérablement selon le type de tissu impliqué, la localisation d'origine et le type d'altération génétique à l'origine de la maladie. La recherche a identifié les altérations génétiques comme étant le principal coupable derrière cette maladie mortelle.

Un cancer est constitué de cellules qui prolifèrent de façon désorganisée, ce qui peut nuire au bon fonctionnement des organes et entraîner la mort de l'individu (Hanahanet Weinberg, 2000). Chaque organe et chaque tissu possèdent plusieurs types de cellules bien définis et disposés de façon structurée (**Feitelsonet al.,2015**). Normalement les signaux que s'échangent ces cellules maintiennent l'équilibre des tissus et assurent que chaque cellule est à sa place et accomplit son rôle. Autrement, ces cellules sont éliminées pour éviter de nuire à leur hôte. Dans le cas des cellules cancéreuses, celles-ci ne répondent plus aux signaux responsables de cet équilibre (Hanahanet Weinberg, 2000). Elles se mettent à se multiplier fortement, même à un endroit inapproprié. Elles envahissent donc les tissus d'organes essentiels sans pour autant en jouer le rôle. Cela a pour effet, à plus ou moins long terme selon le site de la tumeur, d'entraver le fonctionnement des organes envahis et donc, éventuellement, de causer la mort de l'individu. Un cancer peut provenir d'une seule cellule qui acquiert des caractéristiques favorisant sa survie et sa division

La répartition des cancers par tranches d'âges souligne bien la tendance observée depuis le début de leur enregistrement, à savoir, un nombre de cas plus élevé chez les femmes, une apparition plus précoce du cancer chez les femmes (39 ans) que chez les hommes (49 ans) et une diminution du nombre de cas à partir de 65 ans chez les femmes, âge auquel commence l'ascension de l'incidence masculine.

1-3 Forme du cancer les plus fréquentes

Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde avec près de 10 millions de morts en 2020, selon un rapport réalisé par la Société américaine contre le cancer (ACS) et le Centre international de recherche sur le cancer (IARC). En effet, il révèle qu'une personne sur cinq aura un cancer au cours de sa vie et qu'un homme sur huit et une femme sur onze en mourront. En 2020, 19,3 millions de nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués. (Société américaine contre le cancer (ACS), 2020) ; (Centre international de recherche sur le cancer (IARC), 2020).

En terme de mortalité, selon le même rapport, c'est le cancer du poumon qui reste le plus meurtrier avec 1,8 million de décès en 2020 (18%), suivi du cancer colorectal (9,4%), du foie (8,3%), de l'estomac (7,7%) et du sein chez la femme (6,9%). Ce cancer est pourtant largement évitable puisqu'environ les deux tiers des décès du cancer du poumon sont dus au tabagisme. Le taux de mortalité du cancer du poumon est 3 à 4 fois plus élevés dans les pays

Développés que dans les pays en voie de développement, mais cette tendance pourrait bien changer à mesure que le tabagisme évolue puisque 80% des fumeurs vivent dans des pays à revenus faibles ou intermédiaires (Société américaine contre le cancer (ACS), 2020) ; (Centre international de recherche sur le cancer (IARC), 2020). Selon ce rapport, environ 28,4 millions de nouveaux cas de cancer devraient survenir

1-3-1 chez l'homme

Les formes de cancer les plus fréquentes chez l'homme sont ceux du poumon, du côlon-rectum, de la vessie, de la prostate et de l'estomac. Ils constituent 52,5% de tous les cancers masculins. Le cancer du poumon à lui seul représente environ 15% des cancers masculins. Ceci confirme et consolide les tendances depuis 2001 avec la prédominance, chez l'homme, des cancers liés au tabagisme (poumon - vessie), du cancer de la prostate qui connaît une augmentation rapide depuis le début des années 2000 et des cancers digestifs notamment colorectaux. L'élévation de l'incidence des cancers de la prostate se confirme. Il est, aujourd'hui, le 3ème cancer chez l'homme.

1-3-2 Chez la femme

Les formes de cancer les plus fréquentes chez la femme sont celles du sein, du côlon-rectum, de la thyroïde, du col de l'utérus, et de l'ovaire. Ils constituent 68,2% de tous les cancers féminins. Les cancers du sein (40,45%) et du col de l'utérus (12,5%) qui totalisent, à eux deux, 52,95% de tous les cancers féminins.

Par ailleurs, de plus en plus d'enfants et d'adolescents sont touchés par le cancer. L'incidence du cancer augmente, tous les ans, de 1% chez les enfants et de 1,5% chez les adolescents. Les formes de cancer les plus fréquentes chez l'enfant sont celles du système hématopoïétique, des ganglions lymphatiques, de l'encéphale, de l'os et du rein. Ils constituent 59,4% de tous les cancers de l'enfant de sexe masculin et 58,3% de tous les cancers de l'enfant de sexe féminin.

Cancer du sein

Le cancer du sein est la tumeur maligne la plus fréquente chez les femmes et est une maladie hétérogène au niveau moléculaire. Selon l'OMS, il représente 23 % de tous les cancers avec un taux de mortalité de 14% (**Harbeck et al.,2019**).

Grâce au dépistage précoce, le nombre de décès est ralenti de 30%, les femmes atteintes du cancer du sein 20% à 30% sont diagnostiquées entre les intervalles de dépistage (**Gilliland ,2000**).

Nombreux facteurs sont soulignés pour détecter le cancer notamment : facteurs techniques (la technologie d'imagerie et l'interprétation du radiologue), spécificités du patient (l'âge, les comorbidités et la densité mammaire/mammographie) plus des facteurs biologiques (la tumeur

Agressive atteint une taille pathologique et palpable dans la fenêtre de dépistage) (**Ma et al.,1992 ; Burrell et al.,1996**).

1.1 Abscesses mammaires

Les abscesses du sein sont des infections causées par des microorganismes de types aérobie et anaérobies (**Rizzo et al.,2010**).

On distingue les puerpéraux et non puerpéraux qui sont caractérisés par une présentation, facteurs de risque, agents microbiens et traitements différents, les agents responsables appartiennent généralement aux genres *Staphylococcus*, bien que d'autres tels que : *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Enterobacteriaceae* (**Edmiston et al.,1990 ; Laas et al.,2015**).

1.2 Agent causal

Les pathogènes anaérobies constituent de près d'un tiers des cas d'abscesses mammaires notamment *Bacteroides fragilis* (**Al Benwan et al.,2011**).

Le traitement des abscesses du sein reste une question controversée, mais des preuves récentes prennent en charge la nécessité d'une procédure de drainage ou d'une aspiration percutanée guidée par l'image.

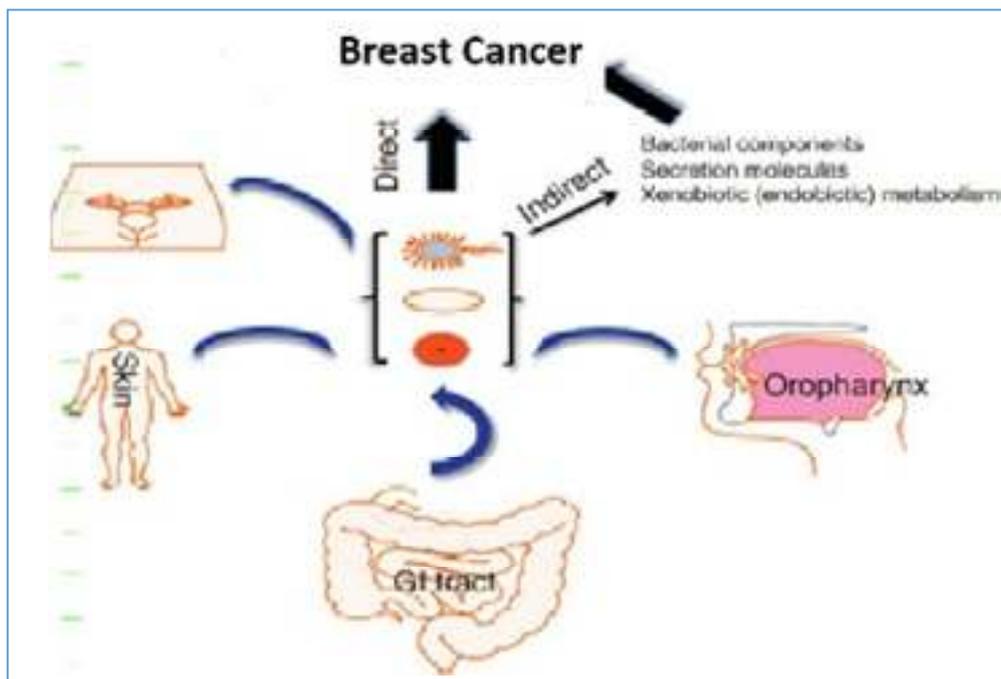


Figure 1 : Schéma de l'influence microbienne sur le cancer du sein (Mani, 2017).

1.3 Les facteurs de risque

Les facteurs de risque pour les cancers du sein d'intervalle sont complètement inconnus densité mammographique élevée, l'utilisation d'un traitement hormonal substitutif (THS), dépistage mammographique antérieur faussement positif ainsi que des antécédents familiaux de cancer du sein en premier degré ont impliqués dans le risque de cancer d'intervalle.

Les cas de cancer d'intervalle affichent un score de risque génétique de cancer du sein (GRS) inférieur, réduit de cela les allèles portés en augmentant le risque de cancer du sein trouvés dans les cas de cancer d'intervalle que le nombre de mutations rares dans 31 gènes similaires au cancer du sein sont plus fréquentes que dans les cas détectés par dépistage (Holm et al.,2020). 20 % des cancers du sein mondial peut être attribuée à des facteurs de risque modifiables, l'obésité, l'inactivité physique et la consommation d'alcool (Danaei et al.,2005).

La consommation de 10g d'alcool par une femme adulte tous le temps augmente le risque de cancer du sein de 7 à 10% chez les ménopausées (Chen et al.,2011 ; Smith-Warner et al.,1998) et en pré ménopause.

1.4 Classification des tumeurs

Plusieurs classifications ont été développées pour regrouper les tumeurs :

- Classement intrinsèque qui regroupe 4 sous types du cancer du sein : luminal A (récepteur des œstrogènes (RE)), de type basal), luminal B (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) avec sans expression ER. Selon la base histologique et les caractéristiques moléculaires, la pratique clinique récente a trouvé 5 sous types du cancer. Le cancer du sein positif exprime ER et/ou le récepteur de la progestérone (PR) alors que cancers du sein négatifs (tnbc) n'expriment pas ER, PR ou HER2 (**Perou et al.,2000**).

Le traitement multidisciplinaire spécialisée améliore la survie et la qualité de vie des patients atteints de cancer du sein métastatique, facteurs culturels ou bien liés au mode de vie et campagnes nationales de sensibilisation sont responsable du cancer du sein autre comprene les règles précoces, le manque de l'allaitement et la ménopause tardive (**Althuis et al.,2005 ; Colditz et al.,2006**).

1.5 Mécanisme d'initiation

Le mécanisme d'initiation du cancer du sein reste mal connu, des efforts ont été mis afin de comprendre l'aspect moléculaire et délimiter sa formation et son évolution. L'évolution clonale de la cellule d'origine et les modèles des souches cancéreuses sont impliqués et compliqués car les cellules souches cancéreuses évoluent eux même de manière clonale mode (**Bombonati et Sgroi, 2011**).

1.6 Evolution du cancer du sein

En point de vue moléculaire, le cancer du sein évolue selon deux diverses voies :

- ✓ Moléculaires de progression liées à l'expression de ER, grade et prolifération tumorale également l'identification des gènes de susceptibilité au cancer du sein réussi à atteindre certains aspects sporadique et héréditaire de la pathogenèse du cancer du sein.
- ✓ La voie de type bas grade est caractérisé par un gain de 1q, une perte de 16q, peu fréquent amplification de 17q12 et signature d'expression génique (GES) avec une majorité de gènes associés au RE phénotype, caryotypes diploïdes ou quasi diploïdes et faible grade tumoral. Le groupe luminal A et dans une certaine mesure le groupe luminal B tombe dans cette voie (**Ellis et al.,2012**).

- ✓ La voie de type haut grade comprend : une perte de 13q, un gain de région chromosomique 11q13 avec amplification de 17q12 (contenant ERBB2, codant HER2) et une signature d'expression de gènes impliqué dans le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. Tumeurs HER2 positives et TNBC (tumeurs composés de grade intermédiaire a élevés), tombent dans cette voie (**Lopez-Garcia et al.,2010**).

✓

1.7 Mécanismes bactérien pour ciblage et suppression des tumeurs

L'avantage fondamental du cancer d'origine bactérienne apparait dans l'utilisation des émetteurs de lumière souches atténuées de *S. Typhimurium* défectueuses en ppGpp synthèse (Δ ppGpp *S. Typhimurium*) et *E. coli* K-12 (MG1655).

Après injection intraveineuse les bactéries accumulées dans les tumeurs, il y'avait une administration à divers types de souris porteuses de tumeurs (**Min et al.,2008 ; Jiang et al.,2013**) donc par voie passive et les mécanismes actifs, les bactéries s'échappent de la circulation sanguine vers le tissu tumoral. Les bactéries pénétrer dans la tumeur par piégeage passif dans le système vasculaire chaotique de la tumeur puis s'écoulent dans la tumeur en raison de l'inflammation causée par une augmentation soudaine de la quantité de tumeur facteur de nécrose α (TNF- α) dans les vaisseaux tumoraux (**Leschner et al.,2009**).

Dans le TME, le mécanisme actif implique la chimiotaxie vers les molécules produites par le tissu tumoral mourant et la faible concentration en oxygène dans les tumeurs hypoxiques, pour obliger les anaérobies (*Clostridium et Bifidobacterium*) (**Malmgren et Flanigan ,1955 ; Dang et al.,2001**) et les anaérobies facultatifs (**Kasinskas et Forbes 2006 ; Kasinskas et Forbes 2007**).

Ciblage tumoral de *Listeria spp*

Le mécanisme de ciblage tumoral de *Listeria spp* implique le système immunitaire de l'hôte en infectant les cellules présentatrices d'antigènes (les cellules dendritiques (CD) ou macrophages, aussi les cellules suppressives myéloïdes (MDSC), qui à son tour contribue le transport des bactéries aux TME. De cette façon, les cellules de *Listeria* résident dans les MDSC et soient protéger de la clairance immunitaire.

La motilité est une caractéristique essentielle qui permet aux bactéries de pénétrer plus profondément dans le tissu tumoral car les cellules de listeria sont éliminées rapidement dans les milieux tissulaires sains. Le métabolisme bactérien et hôte TME influence la colonisation tumorale par l'épuisement des macrophages en entraînant évolution de colonisation tumorale

Bactérienne, alors que les souches bactériennes déficientes pour la biosynthèse montrent une augmentation de la spécificité tumorale (Stritzker et al., 2010).

Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour clarifier pourquoi il est bénéfique pour les bactéries de cibler et se développer dans les tumeurs, il est indéniable que la capacité de bactéries thérapeutiques pour cibler, pénétrer et proliférer dans les tumeurs est un avantage prometteur qui surmonte certaines des limitations actuelles des thérapies conventionnelles.

Les neutrophiles, la déplétion a augmenté le nombre de bactéries intratumorales et a soutenu la propagation bactérienne dans tout le tissu tumoral (Leschner et al., 2009 ; Westphal et al., 2008).

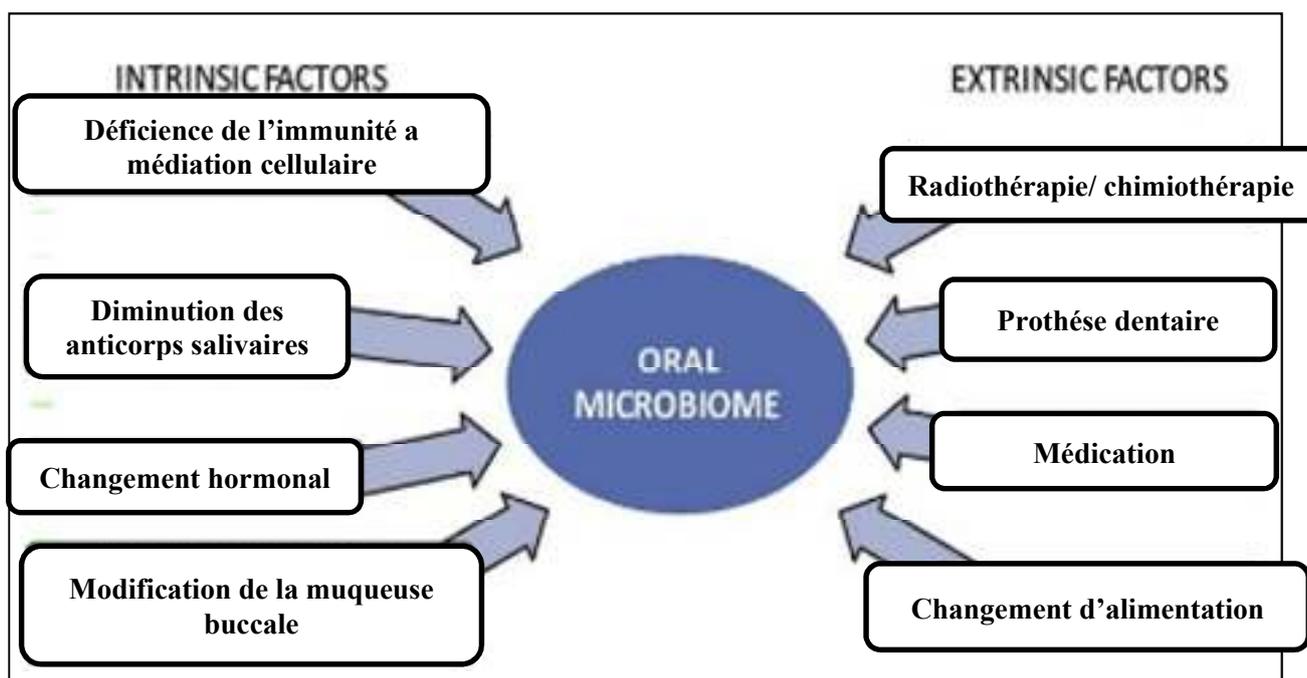


Figure 2 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques affectant la composition et l'homéostasie du microbiome oral (Samaranayake et Matsubara, 2017).

1.8 Cavité buccale

La cavité buccale est un mini écosystème essentiel du corps humain (Albandar et al., 1999), elle offre un habitat pour les communautés microbiennes orales où elles subissent une compétition interspécifique intense pour former la structure du biofilm multi-espèces (Rahman et al., 2015).

Microbiome buccale

Dans la cavité buccale normale on observe une prédominance des espèces du genre, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Veillonella* et *Bacteroids* (Rogers, 2008).

Selon l'âge, l'alimentation et l'hygiène personnelle niveaux d'une personne le nombre et le type de ces microbes se modifier (**Sharma et al.,2018**).

Maladies buccales

L'état dysbiotique, l'altération de la composition microbienne ainsi la perturbation de l'équilibre microécologique entre micro-organismes et l'hôte provoquent des maladies buccales et même systémiques dont les caries dentaires, la parodontite, l'endocardite, pharyngite, pneumonie, méningite (**Li et al., 2022**). *Streptococcus* et *Enterococcus* déplacent leur mode de vie de la microflore bénéfique à la surface de cavité buccale et de l'oropharynx aux agents pathogènes destructeurs en accédant au tissu buccal et au sang flux (**Rogers, 2008 ; Wang, 2012**).

Les *Streptocoques oraux* sont des Gram positif facultatifs anaérobies, ses propriétés biologiques lui permettent l'adhérence au tissus dur et mou, formation de biofilm, cellule-cellule communication et faire combattre l'évolution rapide de l'oral environnement (**Cvitkovitch et al.,2003**).

Plus de 700 espèces ont été découvertes à ce jour et les recherches restent en cours, selon les progrès de la biologie moléculaire et techniques de microbiologie (**Albandar et al., 1999**).

Microbiote oral

Le microbiote buccal inclut plusieurs centaines à plusieurs milliers d'espèces diverses représentant une partie importante du microbiote humain, il est considéré comme un élément essentiel de la cavité buccale et joue un rôle clé dans le maintien de l'équilibre de la voie orale et la protection de l'organisme contre divers types d'infections, parmi les maladies bucco-dentaires les plus courantes basant sur des microorganismes : la carie, la gingivite et la parodontite (**Arweiler et Netuschil ,2016**).

1.9 Liquide biologique (salive)

La salive entière (mixte) est une substance aqueuse avec un mélange complexe d'ions inorganiques, compris le sodium, le potassium, le calcium, le chlorure, le bicarbonate et le phosphate ; baignant les surfaces buccales provient des glandes salivaires majeures et mineures. Les protéines, les enzymes, les glycoprotéines (telles que la mucine) et les agents antimicrobiens constituent les principaux éléments organiques de la salive (**Samaranayake et Matsubara ,2017**).

1.10 Rôle

La salive joue un rôle important dans l'ajustement de la croissance bactérienne, la formation de salive pellicule sur la surface de la dent, mener à une structure d'un film de conditionnement facilite l'adhésion bactérienne, les bactéries profitent des glucides et des protéines de la salive comme une source primaire de nourriture disponible, des facteurs de défense non spécifiques (p. ex., lysozyme, lactoferrine et histatines, qui sont bactéricides et fongicides) sont responsable pour éliminer les organismes exogènes et également exercé par des facteurs de défense spécifiques (p. ex., immunoglobuline A, IgA) trouvés dans la salive. (Samaranayake et Matsubara, 2017).

1.11 Composition

Le liquide buccal ou la salive entière est formé de sécrétions des glandes salivaires majeures et mineures, ainsi que le liquide créviculaire gingival, fournissant le milieu chimique des tissus mous buccaux et les dents (Edgar, 1992).

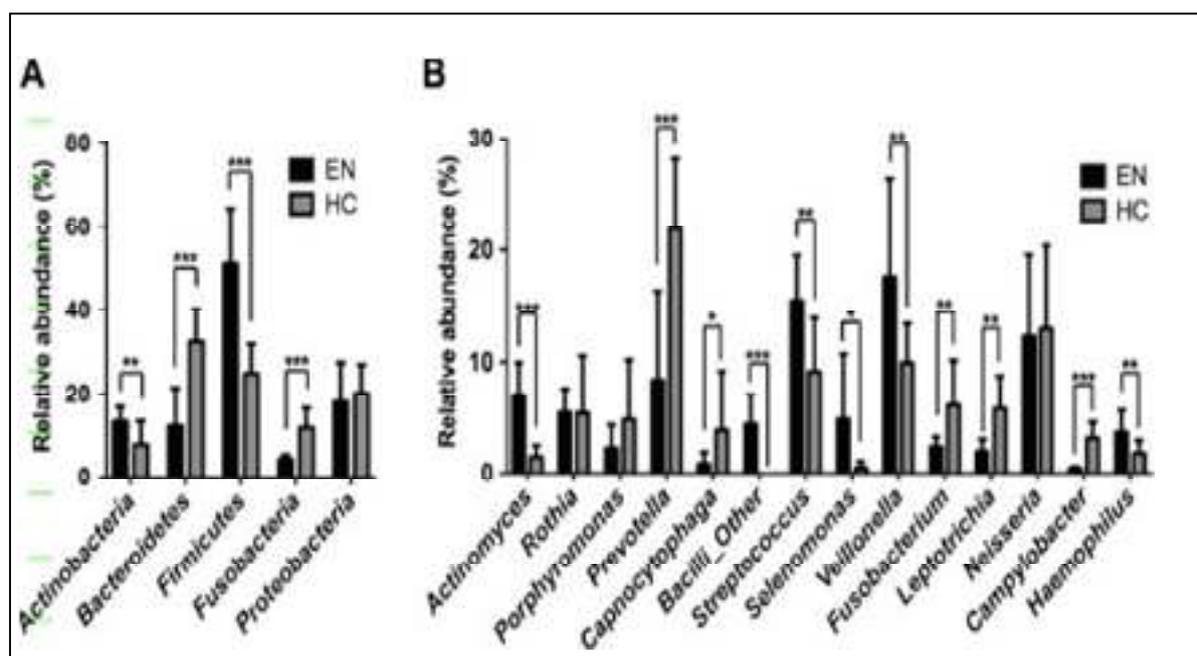


Figure 3 : Composition du microbiote salivaire chez différents taxons. Diagramme à barres montrant la composition bactérienne moyenne des différents taxons de (A) l'embranchement et (B) du genre dans chaque groupe (Ogawa et al., 2018).

EN : sujets âgés vivant en maison de retraite ; HC : sujets témoins sains.

Salive	<i>Neisseria flavescens</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Prevotella histicola</i> , <i>Veillonella parvula</i> , <i>Veillonella atypica</i> , <i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Actinomycetales</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Tannerella</i> , <i>Veillonella</i>
--------	---

Figure 4 : Les principaux groupes bactériens associés à la cavité buccale. (TaKeshita et al.,2016).

Chapitre 2 :
Matériel et Méthodes

2 Matériel et Méthodes

La présente étude a été réalisée durant la période allant du mois de juin jusqu'au mois de juillet 2022 au niveau :

- ❖ Centre anti-cancer du CHU France Fanon de Blida ou on a prélevé les échantillons pour l'étude.
- ❖ Laboratoire ; Gestion et Valorisation des Ecosystèmes Agricoles et Aquatiques (GVEAQ), Institut des Sciences, Centre Universitaire de TIPAZA ou on a réalisé l'étude microbiologique du liquide biologique (la salive).

2.1 Matériel

Matériel biologique

Le liquide biologique choisi dans la présente étude est la salive, élaborés dans des tubes stériles contenu des milieux de transport (milieu BHIB pour les aérobies, milieu AMI pour les anaérobies) afin d'assurer le bon transport et la bonne conservation des microorganismes.

Pour collecter la salive, les patients doivent s'abstenir de manger, de boire et d'avoir tout geste d'hygiène bucco-dentaire pendant au moins 1 heure avant la collecte de la salive. Ainsi, l'heure optimale de collecte est à 8-10 heures du matin. Avant de procéder à celle-ci, il faut effectuer un rinçage de la bouche durant une minute avec de l'eau distillée puis, après 5 minutes, collecter environ 5 ml de salive. L'échantillon collecté doit être traité en laboratoire dans l'heure qui suit (**Khurshid et al, 2016**).

Matériel non biologiques

❖ Milieux de cultures utilisés

Gélose Nutritif (GN) : cibler la flore (milieu non sélectif), Gélose au sang frais et cuit (GS) : bactéries exigeants (milieu d'enrichissement), milieu sabouraud plus chloremphénicol (un antibiotique se sert pour éviter la contamination bactérienne) : isolement des mycètes (Fungi), milieu Columbia : milieu sélectif des anaérobies.

- ❖ **Galerie API20E** : Ce sont des galeries spécifiques des Entérobactéries.
- ❖ **Galerie API20A** : Ce sont des galeries spécifiques des Anaérobies
- ❖ **Galerie API 20NE** destinée à l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries.

- ❖ **Matériel** : verrerie, appareillage disponible dans le laboratoire de la faculté, plus de donné sont retrouvés dans l'**Annexe 1** .

2.2 METHODES

La figure 5 , illustre le protocole suivi lors de l'expérimentation.

Prélèvement

On a réalisé des prélèvements de la salive sur 02 patientes atteintes de cancer du sein, l'une est sous traitement chimiothérapique, et de 05 sujets témoins.

Au préalable, une fiche de consentement explicative a été lue et signée par le malade.

❖ Critères d'exclusion et d'inclusion

- Il faut que les sujets soient à jeun, et qu'il se lavent les dents ou se rincent la bouche 30 minutes avant le prélèvement.
- Eviter de tousser ou de se racler la gorge, il suffit simplement de retenir la salive pendant environ 30 secondes.
- Bien suivre toutes les consignes du laboratoire pour effectuer le prélèvement (quantité suffisante de salive, moment de la journée à privilégier...).
- Dans ces conditions, les patients atteints du cancer du sein qu'elle que soit ont été inclus dans cette l'étude, de même que les sujets témoins.

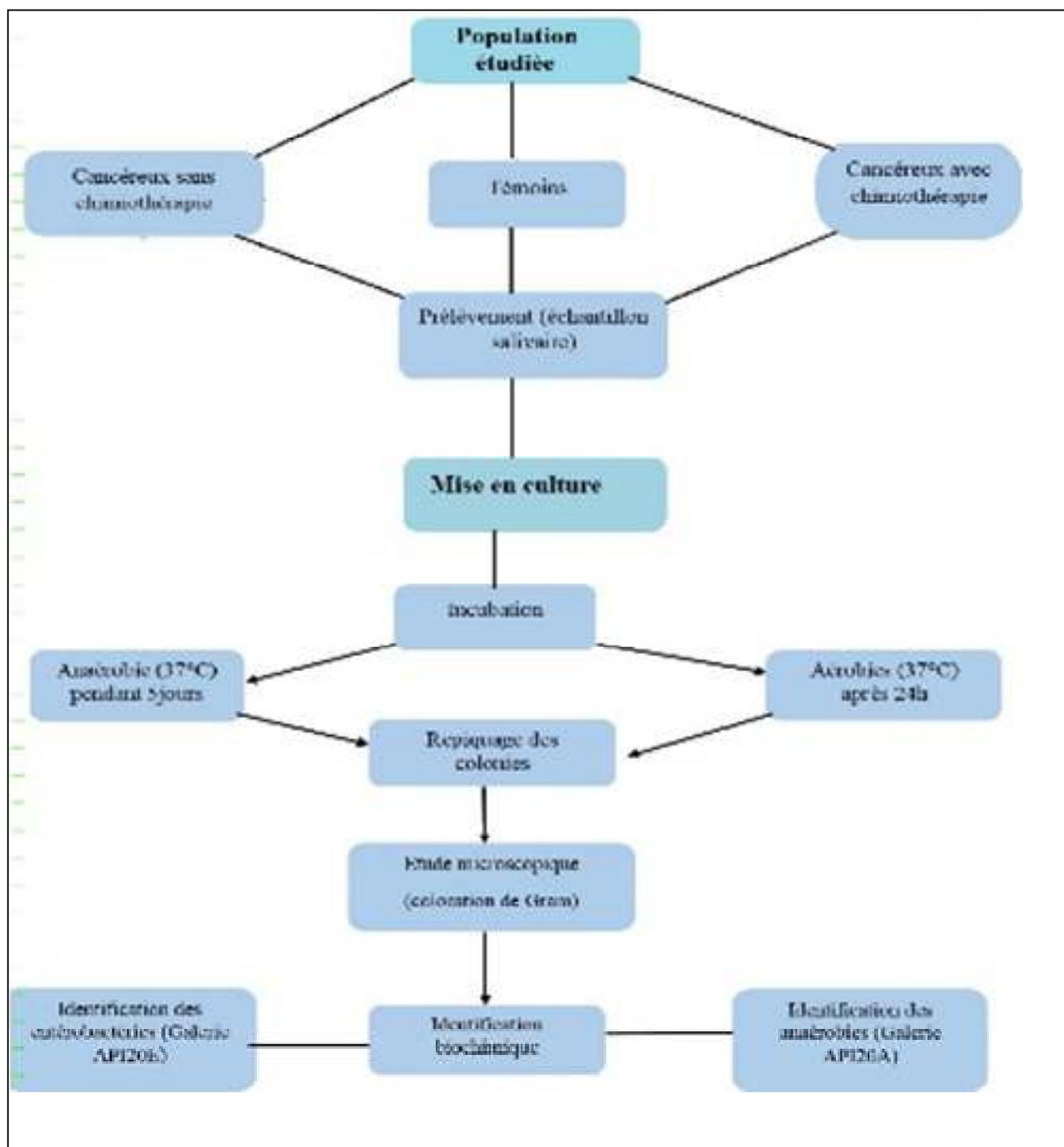


Figure 5 : Organigramme du plan expérimental

❖ Mode opératoire

Le même protocole a été suivi pour l'ensemble des prélèvements (07) :

- Ecouvillons stériles écrites des informations nécessaires de chaque patient (nom, prénom, sexe).
- à l'aide d'une ecouviette, on fait un ecouviollage oropharyngé de la salive pendant 30sec sans touché les parois de la bouche.
- après l'étape de flambage, on met l'échantillon salivaire dans le tube contenant les milieux de conservation (BHIB, AMI) pour les aérobies ou anaérobies respectivement puis reflomber une autre fois.
- L'échantillon est ensuite placé dans une glaciere a une température ambiante plus quatre (+4C°) favorisant les conditions du transport et la conservation des germes jusqu'au laboratoire afin d'être mis en culture dans les plus brefs délais.

Méthode expérimentale

2.2.1.1 Mise en culture

Après passage au vortex, on prend 50 µl de la solution mère que l'on déposera au centre des géloses déjà mentionnés. On étalera grâce à la technique en râteau : une pipette pasteur est passée à la flamme et transformée en râteau, qui nous servira à étaler la goutte centrale de manière uniforme sur toute la surface de la gélose.

2.2.1.2 Mise en anaérobiose

Les géloses sont ensuite placées dans des jarre d'anaérobiose à 37°C durant 5 jours pour les bactéries anaérobies.

Incubation à 37°C, lecture après 24h d'incubation pour les bactéries aérobies.

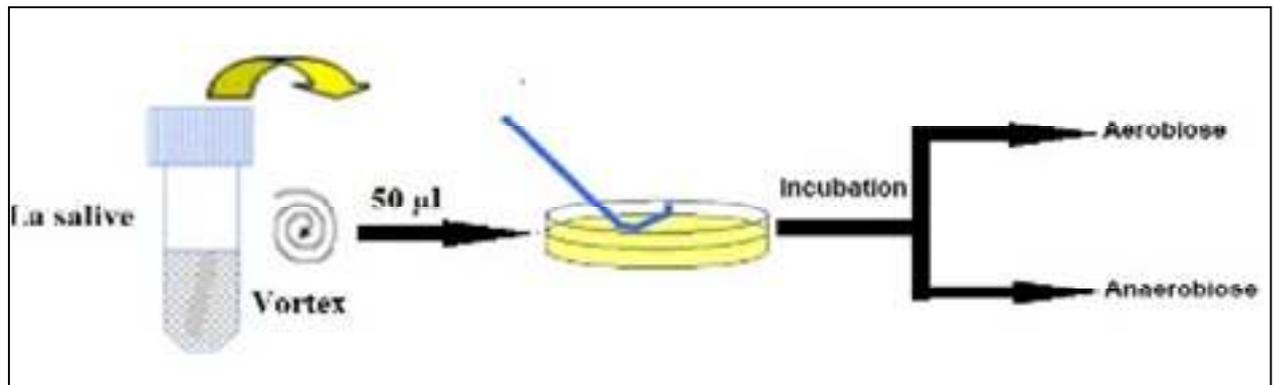


Figure 6 : Protocole expérimental de mise en culture et incubation

Ensemencer le prélèvement sur milieux Columbia additionnés de 5% de sang frais de mouton ou de cheval, ou de 5 % de sang laqué pour les parodontites pour la recherche des bactéries anaérobies pigmentées du genre *Prevotella*, et *Porphyromonas*.

Les milieux sont incubés à 37°C en anaérobiose, et sont examinés après 48h d'incubation pour les bactéries à croissance rapide comme *Bacteroides*, *Propionobacterium*etc.

Pour les bactéries de notion de culture lente ou négative antérieurement, les boîtes sont incubées 3 à 5 jours. Ex dans le cas de recherche d'*Actinomyces*, *Porphyromonas*.

2.2.1.3 Identification

L'identification des bactéries a été faite selon les méthodes utilisées en routine au laboratoire.

2.2.1.3.1 Observation macroscopique

L'étude macroscopique est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur les différents milieux utilisés ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies. On élimine celles qui ne sont pas exploitables : colonies trop serrées et donc non prélevables, ou au contraire celles sur lesquelles rien n'a poussé.

2.2.1.4 L'aspect microscopique

2.2.1.4.1 Observation à l'état frais

L'examen à l'état frais est une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif $\times 40$. Les renseignements obtenus par cette observation concernent principalement la mobilité des bactéries. En fonction de la mobilité observée, si elle

est présente, on peut préjuger du type de ciliature de la bactérie (monotriche, péritriche, etc) ce qui oriente sur la bactérie isolée (Schaechter, 2010).

2.2.1.5 La coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de distinguer deux (2) types de bactéries, les bactéries en Gram négatifs (G-) et les bactéries en Gram positives (G+). Celles-ci diffèrent de part de la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, ou la présence d'une membrane externe. (Schaechter, 2010).

La culture doit être pure : aussi, si après la coloration de Gram, on observe un mélange de deux types de bactéries (Cocci et bacilles, ou bacilles et filaments ...), un réisolement est effectué. Que l'on remet en anaérobiose à 37°C, en suivant exactement le même protocole que celui décrit précédemment. Les géloses seront ensuite analysées, et chaque colonie différente prélevée et colorée.

Mode opératoire

- Le frottis a été confectionné à partir d'une goutte de la suspension bactérienne sur une lame propre étalé en mouvement circulatoire du centre vers la périphérie, une fois réalisé le frottis est séché à une température ambiante puis fixé par trois passages successifs dans la flamme du bec bunsen puis passé à la coloration.
- Recouvrir le frottis par le violet de gentiane et laisser réagir pendant une minute, rincer la lame puis recouvrir avec le Lugol et laisser réagir pendant 30 secondes.
- Rincer à l'eau ensuite décolorer à l'alcool à 95°C.
- Après le lavage à l'eau, le frottis sera recoloré à la fuschine pendant une minute (contre coloration),

Lecture microscopique

L'observation se fait au microscope optique grossissement x100 après l'ajout de l'huile d'immersion.

La coloration des bactéries en rose est en faveur d'un Gram négatif, tandis qu'en violet oriente sur un Gram positive.

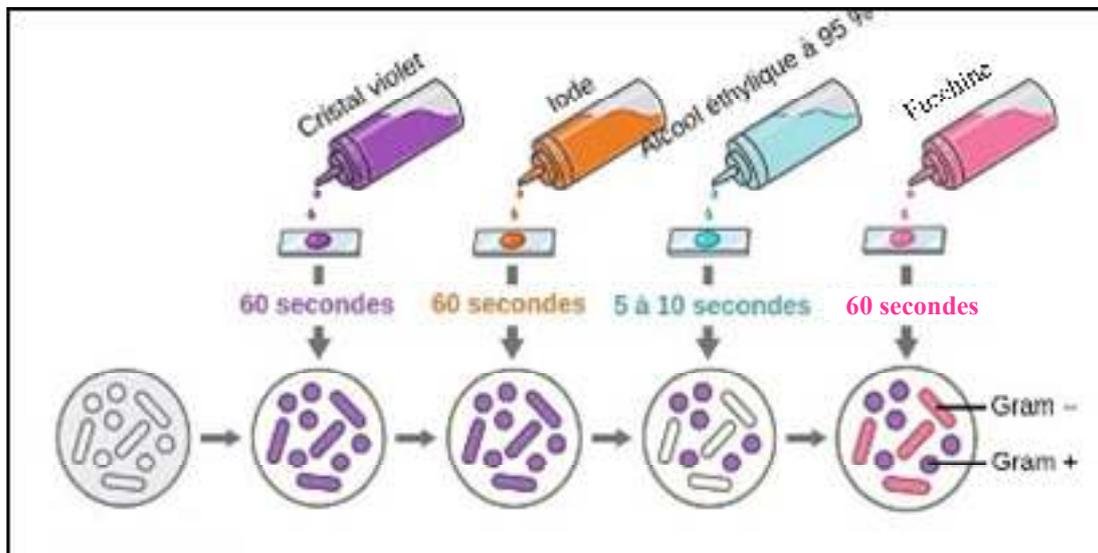


Figure 7 : Protocole de la coloration de Gram

2.2.1.6 Identification biochimique

Elle est faite par une méthode biochimique : les galeries API

Galleries API 20 E

On réunit le fond et le couvercle de la galerie avec la répartition d'environ 5 ml d'eau distillé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, sans oublié d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

On prépare une suspension bactérienne trouble à partir de quelques colonies prélevées d'une culture jeune émulsionnées dans 5 ml d'eau physiologique.

- Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests, on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Les galeries sont ensuite placées 24h en aérobie à 37°C.

Lecture des galeries API20E

Se fait après ajout de réactifs (Kovaks VPI+VPII et TDA) et codification des réactions en un profil numérique en se référant à un catalogue analytique ou l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation.



Figure 8 : Lecture des galeries (Photo originale)

❖ Galerie API 20A

Ce système se compose de 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. La suspension bactérienne est faite dans l'ampoule API 20A médium, permettant ainsi la dissolution des substrats, ensuite, elle est répartie dans des tubes. Les métabolites produits sont mis en évidence par différents indicateurs de pH ou par addition de réactifs après 24 à 48 h d'incubation à 37°C en anaérobiose.

Mode opératoire

❖ Préparation de l'inoculum :

- Ouvrir l'ampoule de l'API 20A médium.
- A l'aide d'une anse, prélever de la colonie suspecte sur Columbia au sang et émulsifier les germes contre la paroi de l'ampoule jusqu'à ce que l'opacité de la suspension soit supérieure ou égale à 3MC Farland.

❖ Préparation de la galerie :

- A l'aide d'une pipette, inoculer la galerie avec API 20A médium ensemencé en

évitant la formation de bulles, et en inclinant légèrement la galerie.

- Pour le test **GEL**, **ESCU** remplir tube et cupule.
- Pour le test **IND**, remplir seulement le tube avec API 20A médium et remplir la cupule avec de l'huile de vaseline pour éviter l'évaporation de l'indole formé.
- Incuber à 37°C, 24 à 48h en anaérobiose.

Lecture des galeries

Après 24 à 48h d'incubation, et selon la bactérie suspecte, on observe les réactions ; si elle a donné une réponse satisfaisante, on ajoute les réactifs adéquats, puis on lit le résultat conformément Catalogue Analytique API 20A.

❖ Galerie Api Strep

La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Mode opératoire

❖ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

❖ Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml) ou utiliser un tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additif.
- A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée.
- Réaliser une suspension très dense : opacité supérieure à 4 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément .

Lecture de la galerie

Après 4 heures d'incubation :

- Ajouter les réactifs : test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2 .
- test HIP : 2 gouttes de NIN .
- tests PYRA, DGAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B .

Attendre 10 minutes, puis lire toutes les réactions en se référant au Tableau de Lecture. Si nécessaire, exposer la galerie à une lampe forte (1000 W) 10 secondes pour décolorer le réactif en excès dans les tubes PYRA à LAP.

Si , pour le profil obtenu, la note suivante est indiquée : identification non valide avant 24 h d'incubation Alors, relire après 24 heures les réactions ESC, ADH et RIB à GLYG sans relire les réactions enzymatiques (HIP, PYRA, DGAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP) et VP.

Chapitre 3 :

Résultats et discussion

3. RESULTATS

02 sujets cancéreux un avec chimiothérapie et le deuxième sans chimiothérapie et 5 sujets témoins sains qui habitent la région de Blida et Tipaza, ont répondu aux critères d'inclusion et d'exclusion et sont alors inclus dans cette étude. L'âge moyen de la population est de 38 ans (± 5 ans), avec une amplitude de 20 à 50 ans.

3.1 Résultats de l'examen macroscopique et microscopique des prélèvements

L'analyse macroscopique et microscopique de tous les prélèvements révèle un polymorphisme de la flore bactérienne pour les deux populations mais il était beaucoup plus variable chez les témoins.

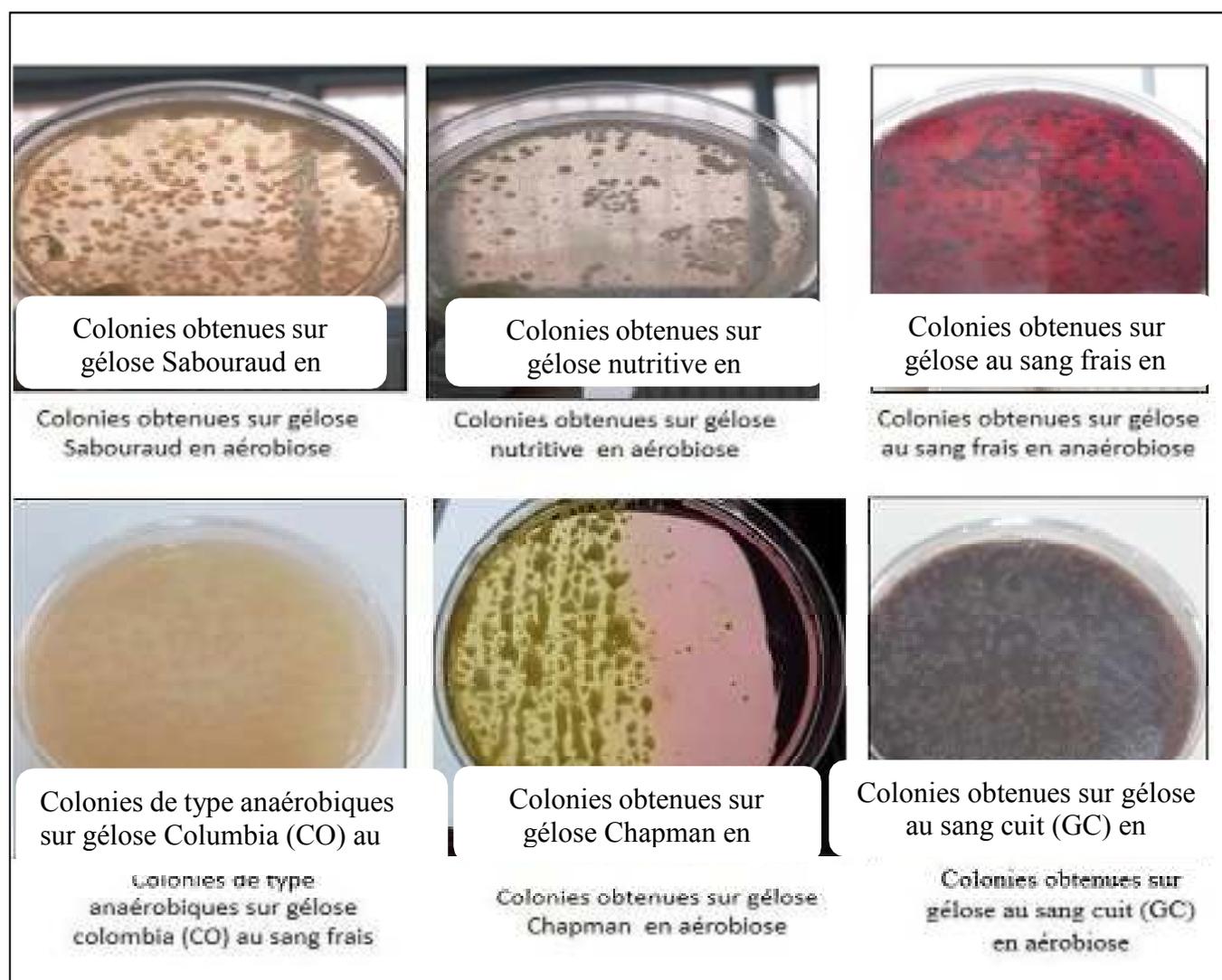


Figure 9 : Aspect macroscopique des colonies obtenues (Photo originale).

L'état frais des prélèvements des sujets cancéreux nous a permis de constater que la microflore bactérienne de ces derniers est polymorphe avec une faible présence des bactéries mobiles. Des études antérieures ont considéré que le grand nombre des bactéries anaérobies à Gram négatif mobiles est un signe de lésions parodontales (Noiri *et al.*, 2001).

○ La coloration de Gram

L'observation microscopique par la coloration de Gram nous a permis de constater que les morphotypes Gram positif sont plus observés que les Gram négatif pour les deux ; les sujets témoins et les sujets cancéreux. De même, les Cocci étaient prédominants par rapport aux bacilles pour tous les prélèvements analysés (Voir Figure 10).

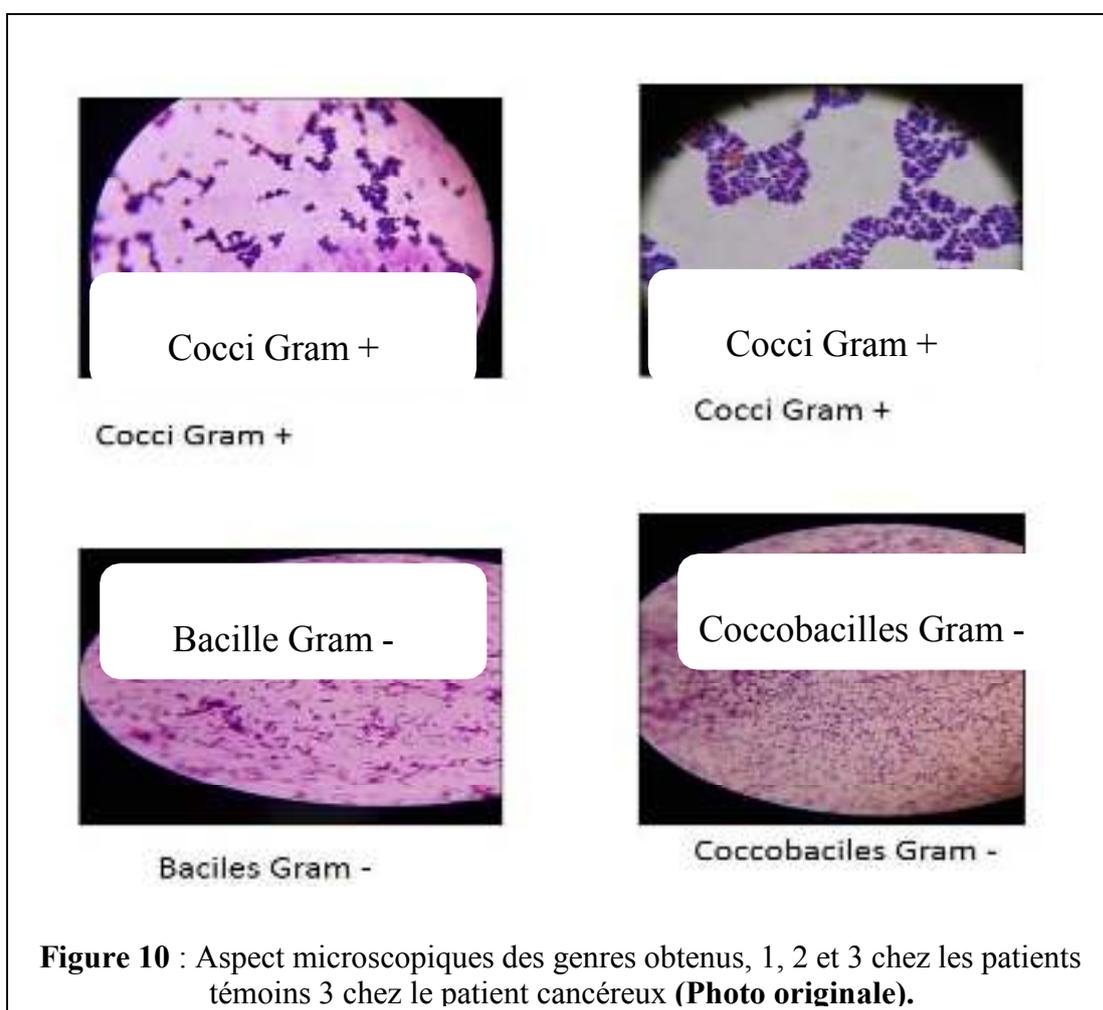


Figure 10 : Aspect microscopiques des genres obtenus, 1, 2 et 3 chez les patients témoins 3 chez le patient cancéreux (Photo originale).

Après examen microscopique par coloration de Gram, les bactéries ont subi un test de catalase. Les Cocci Gram+ catalase+ ont été identifiées par le biais des mini-galeries API 20 Staph et les Cocci Gram+ catalase- ont été identifiées à l'aide des mini-galeries API 20 Strep.

Notre étude nous a permis d'isoler au total 15 Cocci Gram+ catalase- chez les sujet témoins et elles étaient identifiées comme *Streptococcus sp* et 7 Cocci Gram+ catalase+ elles étaient identifiées comme *Staphylococcus sp* et *Micrococcus sp*. En revanche chez les cancéreux on a pu isoler 5 souches Cocci Gram+ catalase- et 2 souches Cocci Gram+ catalase+.

○ Les genres identifiés

Streptococcus

Ce sont des Cocci en chainettes, Gram+, immobiles, catalase-, oxydase-, aéro-anaérobies facultatifs. Les résultats des plaques API 20 Strep nous a permis d'identifier 3 espèces citées dans le tableau suivant ou *Streptococcus sanguinis* était la plus rencontrée par un total de 10 souches sur 15 suivis par *S. mutans* avec 4 souches et une souche *S. oralis*.

Tableau I : Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) des *Streptocoques* identifiés

	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF
<i>S.sanguinis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>S.mutans</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.oralis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Staphylococcus sp et *Micrococcus sp*.

Ce sont des Cocci Gram+ en grappes de raisin, catalase+, oxydase-, immobile, aéro-anaérobies facultatifs isolés sur le milieu Chapman. Dans notre étude on n'a pas pu identifier l'espèce on a juste différencié le genre *Micrococcus* et *Staphylococcus* par l'aspect microscopique et macroscopique en plus des tests catalase et oxydase. En effet les *Micrococcus* sont des Cocci en paires, Gram+, catalase+, oxydase+, immobile, aérobies.

Les deux espèces ont été identifiées chez les témoins et les cancéreux.

Prevotella sp.

D'autre part, notre étude nous a permis d'identifier chez les cancéreux 3 souches anaérobies en forme bacillaires Gram – diplocoques et en amas immobiles isolés sur gélose Columbia au sang frais sur des grandes colonies rondes avec noircissement. Les tests catalase et oxydase étaient négatifs ces trois souches ont été identifiés comme *Prevotella sp* après ensemencement sur Galerie API 20A.

Tableau II : Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de *Prevotella sp*

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Prevotella sp.</i>	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-

Klebsiella

Ce sont des coccobacilles Gram-, catalase+, immobile, aéro-anaérobies facultatifs. Deux souches ont été isolées chez les cancéreux et était identifiées comme *K. pneumoniae* après ensemencement de la galerie API 20E.

Tableau III : Résultats des tests biochimiques (Api 20E) de *K. pneumoniae*.

Espèce	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-

Tableau IV : Nombres des espèces bactériennes isolées à partir des sujets cancéreux et des sujets témoins.

Espèces	Cancéreux	Témoins
Bactérie aérobie Cocci Gram-positif		
<i>Streptococcus sanguinis</i>	4	10
<i>Streptococcus mutans</i>	1	4
<i>Streptococcus oralis</i>	0	1
<i>Staphylococcus sp</i>	5	2
<i>Micrococcus sp</i>	1	0
Bacille Gram-négatif		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0
Bacilles Gram-négatif anaérobie		
<i>Prevotella sp.</i>	3	0

3 Discussion

Les bactéries orales jouent un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme, le genre bactérien *Streptococcus* est la microflore dominante que l'on trouve couramment dans la communauté bactérienne orale.

D'après **Cobo et al., (2020)**, il existe peu d'études portant sur les caractéristiques microbiologiques et cliniques des abcès mammaires causés uniquement par des microorganismes anaérobies. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux microorganismes de type aérobie et anaérobie isolé à partir des échantillons salivaires chez des sujets cancéreux, l'une a déjà subi la chimiothérapie alors qu'une autre, elle n'a pas encore le reçu.

Parmi les échantillons analysés, on a constaté la présence 15 bactéries de Gram + ayant une forme Cocci chez les sujets témoins, , cela est en accord avec les résultats de **Rogers ,(2018) et Wang et al .,(2012)** ont confirmés la présence de diverses espèces du genre *Streptococcus* (**cocci , Gram+**) plus 7 bactéries du genre *Enterococcus* (**cocci, Gram+**), (*Staphylococcus* (**cocci, Gram+**) qui sont les bactéries prédominantes communément trouvées dans la cavité buccale.

Bien que les *Staphylocoques* soient les principaux agents responsables, les bactéries anaérobies peuvent jouer un rôle dans certaines circonstances.

Une étude de **Giamarellou et al., (1994)** a retrouvé des micro-organismes anaérobies deux fois plus souvent que des aérobies dans des infections aiguës.

La présente étude a permis d'identifier les genres bactériens présents dans les échantillons salivaires qui montrent les différences entre les cancéreux aussi que les sujets sains.

Dans les échantillons du groupe cancéreux *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Micrococcus* ont montré une plus grande abondance relative, tandis que *Prevotella sp* et *K. pneumoniae* avaient une abondance relative plus faible.

Ces résultats corroborent les résultats de **Sharma et al., (2018)** qui ont mené une étude comparative de la salive des patients atteints d'un cancer de la tête et du cou et la salive des individus en bonne santé pour établir une relation entre la flore orale et le cancer. La salive des patients atteints de cancers de la bouche a soulevé des concentrations de certaines bactéries, dont les *Streptococcus*, ces bactéries peuvent être utilisées comme outils de diagnostic possibles dans la détection précoce du cancer buccale. L'étude de **Chocolatewala et al., (2010)** ont tenté de rassembler toutes les données scientifiques pertinentes à l'association apparente entre les micro-organismes et le cancer buccal. Ils ont soutenu que, malgré l'intérêt grandissant dans l'association possible entre les bactéries et les différentes étapes de l'évolution du cancer, il reste

Chapitre3 : Résultats et discussion

Encore beaucoup à faire. **Gendron et al., (2000)** ont estimé que la cavité buccale est un réservoir de bactéries pathogènes qui peuvent provoquer plusieurs pathologies et **Laxet et al., (2002)** ont tenté d'expliquer comment les bactéries peuvent causer le cancer.

Conclusion

Conclusion

Plusieurs études récentes ont rapporté une association étroite entre cancer du sein et la flore buccale microbienne.

Rappelons que notre étude avait pour but l'identification grâce à des prélèvements salivaires, les microorganismes présents chez les sujets atteints du cancer avec et sans chimiothérapie comparé à des témoins en bonne santé.

Nous pouvons conclure que les principaux agents responsables appartiennent aux genres *Staphylococcus*, bien que d'autres types de microorganismes aient été impliqués, tels que *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Enterobacteriaceae*.

Nous avons constaté aussi que :

- Les *Streptococcus*, bactéries Cocci gram + catalase- sont les prédominants chez les témoins aussi bien chez les cancéreux.
- Moins fréquence du genre *Prevotella* et *Klebsiella* chez les cancéreux.
- Forte proportion des bactéries anaérobies que les aérobies.

Notre échantillonnage est insuffisant pour confirmer la présence de ces microorganismes dans le cas du cancer du sein. Cependant l'échantillonnage doit être augmenté pour identifier les microorganismes associés dans différents type de cancer avec ou sans chimiothérapie.

Références Bibliographiques

A

Albandar, J. M., Brunelle, J. A., & Kingman, A. (1999). Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994. *Journal of periodontology*, 70(1), 13-29.

Al Benwan, K.; Al Mulla, A.; Rotimi, V.O. A study of the microbiology of breast abscess in a teaching hospital in Kuwait. *Med. Princ. Pract.* 2011, 20, 422–426.

Althuis, M. D., Dozier, J. M., Anderson, W. F., Devesa, S. S. & Brinton, L. A. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973–1997. *Int. J. Epidemiol.* 34, 405–412 (2005).

Arweiler, N. B., & Netuschil, L. (2016). The oral microbiota. *Microbiota of the Human Body*, 45-60.

B

Bombonati, A. & Sgroi, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. *J. Pathol.* 223, 307–317 (2011).

Burrell, H. C. et al. Screening interval breast cancers: mammographic features and prognosis factors. *Radiology* 199, 811–817 (1996)

C

Campbell, M. J., McCune, E., Johnson, B., O'Meara, T., Heditsian, D., Brain, S., & Esserman, L. (2019). Breast cancer and the human oral and gut microbiomes. *Cancer Research*, 79(13_Supplement), 2830-2830.

Centre for Molecular Medicine and Biobanking, University of Malta, Msida, MSD2080, Malta. E-mail address: Duncan.Ayers@um.edu.mt (D. Ayers). *Non-coding RNA Research* 5 (2020) 77–82 Available online 13 May 2020 2468-0540/ © 2020 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co., Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/BY/4.0/>).

Chen, W. Y., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A. & Willett, W. C. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA* 306, 1884 (2011).

Chocolatewala, N., Chaturvedi, P., & Desale, R. (2010). The role of bacteria in oral cancer. *Indian journal of medical and paediatric oncology*, 31(04), 126-131.

Références Bibliographiques

Cobo, F., Guillot, V., & Navarro-Marí, J. M. (2020). Breast abscesses caused by anaerobic microorganisms: Clinical and microbiological characteristics. *Antibiotics*, *9*(6), 341.

Colditz, G. A., Sellers, T. A. & Trapido, E. Epidemiology — identifying the causes and preventability of cancer? *Nat. Rev. Cancer* 6, 75–83 (2006).

Cvitkovitch, D.G., Li, Y.H. and Ellen, R.P. 2003. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J. Clin. Invest.* 112, 1626-1632.

D

Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. & Ezzati, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366, 1784–1793 (2005)

Dang, L. H., Bettegowda, C., Huso, D. L., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 98, 15155–15160 (2001).

Edgar, W. M. (1992). Saliva: its secretion, composition and functions. *British dental journal*, 172(8), 305-312.

Edmiston, C.E., Jr.; Walker, A.P.; Krepel, C.J.; Gohr, C. The nonpuerperal breast infection: Aerobic and anaerobic microbial recovery from acute and chronic disease. *J. Infect. Dis.* 1990, 162, 695–699.

Ellis, M. J. et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 486, 353–360 (2012)

F

Feitelson, M.A., et al., Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*, 2015. 35 Suppl: p. S25-54.

G

Giamarellou, H.; Soufís, M.; Antoniadou, A.; Cogas, J. Periareolar nonpuerperal breast infection: Treatment of 38 cases. *Clin. Infect. Dis.* 1994, 18, 73–76.

Gilliland, F. D. Biologic characteristics of interval and screen-detected breast cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 743–749 (2000).

Giordano-Kelhoffer, B.; Lorca, C.; March Llanes, J.; Rábano, A.; del Ser, T.; Serra, A.; Gallart-Palau, X. Oral Microbiota, Its Equilibrium and Implications in the Pathophysiology of Human Diseases: A Systematic Review. *Biomedicines* 2022, 10, 1803.

H

Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *cell*, 2000. 100(1): p.57-70.

Feitelson, M.A., et al., Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*, 2015. 35 Suppl: p. S25-54.

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., ... & Tsang, J. F. (2019). Cardoso. *Breast cancer. Nat. Rev. Dis. Primers*, 5, 66.

Holm, J., Humphreys, K., Li, J., Ploner, A., Cheddad, A., Eriksson, M., ... & Czene, K. (2020). Risk factors and tumor characteristics of interval cancers by mammographic density.

J

Jiang, S. N. et al. Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent. *Mol. Ther.* 21, 1985–1995 (2013).

K

Kasinskas, R. W. & Forbes, N. S. Salmonella typhimurium specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro. *Biotechnol. Bioeng.* 94,710–721 (2006).

Kasinskas, R. W. & Forbes, N. S. Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res.* 67, 3201–3209 (2007) .

Kerlikowske, K. et al. Efficacy of screening mammography. A meta-analysis. *JAMA* 273, 149–154 (1995)

Kilian M, Chapple IL, Hannig M, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016 ;221(10) :657-666.

L

Laas, E. ; Touboul, C. ; Kerdraon, O. ; Catteau-Jonard, S. Mastites inflammatoires et infectieuses du sein en dehors de la grossesse et de la période d'allaitement : Recommandations. *J. Gynecol.Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 2015, 44, 996–1016.

Leschner, S. et al. Tumor invasion of Salmonella enterica serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF-alpha. *PLoS ONE* 4, e6692 (2009).

Li, X., Liu, Y., Yang, X., Li, C., & Song, Z. (2022). The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Frontiers in Microbiology*, 13.

Lopez-Garcia, M. A., Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C. & Reis-Filho, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways: molecular evolution of breast cancer. *Histopathology* 57, 171–192 (2010).

M

Ma, L. et al. Case-control study of factors associated with failure to detect breast cancer by mammography. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 781–785 (1992).

Malmgren, R. A. & Flanigan, C. C. Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer Res.* 15, 473–478 (1955).

Mani, M. breast Cancer, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* (151), 217.

Min, J. J. et al. Noninvasive real-time imaging of tumors and metastases using tumor-targeting light-emitting *Escherichia coli*. *Mol. Imaging Biol.* 10, 54–61 (2008).

Q

Ogawa, T., Hirose, Y., Honda-Ogawa, M., Sugimoto, M., Sasaki, S., Kibi, M., ... & Maeda, Y. (2018). Composition of salivary microbiota in elderly subjects. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.

P

Perou, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752 (2000).

Pike, M. C., Krailo, M. D., Henderson, B. E., Casagrande, J. T., & Hoel, D. G. (1983). ‘Hormonal’ risk factors, ‘breast tissue age’ and the age-incidence of breast cancer. *Nature*, 303(5920), 767-770.

R

Rahman, M., Islam, M. N., Islam, M. N., & Hossain, M. S. (2015). Isolation and identification of oral bacteria and characterization for bacteriocin production and antimicrobial sensitivity. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 103-109.

Rizzo, M.; Gabram, S.; Staley, C.; Peng, L.; Frisch, A.; Jurado, M.; Umpierrez, G. Management of breast abscesses in nonlactating women. *Am. Surg.* 2010, 76, 292–295.

Rogers, A. 2008. *Molecular Oral Microbiology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

S

Samaranayake, L., & Matsubara, V. H. (2017). Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dental Clinics*, 61(2), 199-215.

Schaechter, M. (Ed.). (2010). *Desk encyclopedia of microbiology*. Academic Press.

Sharma, N., Bhatia, S., Sodhi, A. S., & Batra, N. (2018). Oral microbiome and health. *AIMS microbiology*, 4(1), 42.

Smith-Warner, S. A. et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 279, 535 (1998)

Stritzker, J. et al. Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility. *Int J. Med. Microbiol.* 300, 449–456 (2010).

T

Tabar, L. et al. The Swedish two county trial of mammographic screening for breast cancer: recent results and calculation of benefit. *J. Epidemiol. Community Health* 43, 107–114 (1989).

Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: The Hisayama Study. *Sci Rep.* 2016; 6:22164.

W

Wang, Q. Q., Zhang, C. F., Chu, C. H., & Zhu, X. F. (2012). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International journal of oral science*, 4(1), 19-23.

Westphal, K., Leschner, S., Jablonska, J., Loessner, H. & Weiss, S. Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. *Cancer Res.* 68, 2952–2960 (2008).

Z

Zhang C-Z, Cheng X-Q, Li J-Y, Zhang P, Yi P, Xu X, et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci.* 2016;8(3):133–7.

Zhang Y, Sun J, Lin C-C, Abemayor E, Wang MB, Wong DTW. The emerging landscape of salivary diagnostics. *Oral Health Dent Manag.* 2014 ;13(2):200-10.

Annexes

Annexe 1 :

- Milieux de culture utilisés (dans 1 l. d'eau distillée)

Composition du milieu Gélase nutritive (GN)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande	4 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar.....	1 g

Ph=7,3



Composition du milieu Gélase au sang (GS)

Mélange spécial de peptones	23 g
Amidon.....	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	10 g
Sang de mouton.....	50 ml

Ph = 7,3



Composition du milieu Gélase au sang cuit (GC)

Peptone de viande.....	10 g
Peptone de caséine.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Agar.....	18 g
Extrait de levure.....	50 ml

Ph = 6,9



Composition du milieu Columbia (CO)

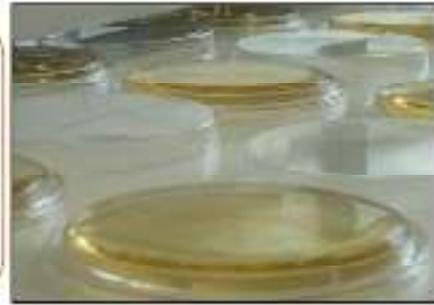
Polypeptone.....	23 g
Amidon de maïs	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	13,5 g

Ph=7,3



Composition du milieu Sabouraud+ Chlorophénicol (S)

Peptone peptique de viande.....	10g
Glucose.....	20g
Chloramphénicol.....	0,05 g
Agar.....	15g
Ph=5,7	



Composition du milieu Gélose Hektoen

Protéose peptone.....	12 g
Extrait de levure.....	3 g
Chlorure de sodium / Thiosulfate de sodium.....	5 g
Sels biliaires.....	9 g
Citrate de fer III et d'ammonium.....	1,5 g
Salieme.....	2 g
Lactose/ Saccharose.....	12 g
Fuschine acide.....	0,1 g
Bleu de bromothymol.....	0.065 g
Agar.....	14g



Milieux de transport en 1L d'eau distillée

Composition du milieu Gélose AMI

Chlorure de sodium.....	3 g
Chlorure de Potassium/ Phosphate monopotassique.....	0,2 g
Chlorure de magnésium / Chlorure de Calcium.....	0,1 g
Phosphate disodique.....	1,15 g
Gélose.....	4 g
Thioglycolate de sodium.....	1 g



Composition du milieu Gélose BHR

Protéose peptone.....	10 g
Infusion de cervelle de veau.....	12,5 g
Infusion de cœur de bœuf / Chlorure de sodium.....	5g
Glucose.....	2 g
Hydrogénophosphate de sodium.....	2,5 g



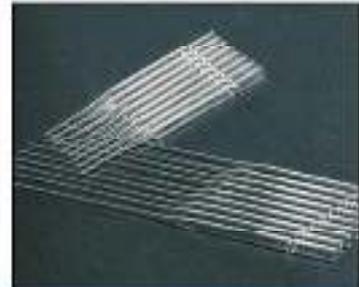
• Verrerie et appareillage de laboratoire



Bec bunsen



Boîtes de Pétri



Pipettes Pasteur stériles à usage



Fourne



Microscope optique



Jarre à CO₂



Agitateur Vortex



Ecouvillon stériles



L'huile à immersion



Lames et lamelles



Galerie API

Bain Marie

Glacière

- Solutions



1-Violet de Gentiane

2-Iugol

3-Alcool

4. Fuchine

Alcool 95°C

Eau distillé stérile

Eau de javel

Réactif de kovaks, TDA, VPI et VPII

