



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Analyse Protéomique et Santé

Intitulé :

Recherche des biomarqueurs du cancer du côlon dans la salive

Présenté et soutenu par :

Le : 30/06/2015

BENSALEM Imène MERNIZE Anfel

Jury d'évaluation :

Président du jury : BELLIL Inès (MC. UFM Constantine)

Rapporteur : KHELIFI Douadi (Prof. UFM Constantine)

Examineurs : GRAMMA Maamar (Chargé de cours. UFM Constantine)

Année universitaire

2014 - 2015

Remerciements

*En préambule à ce mémoire, louange à **Dieu** le tout miséricordieux pour son guide, son aide dans un parcours acharné envers le savoir scientifique et qui nous a permis de mener à bien ce travail.*

Nos premiers remerciements iront à notre rapporteur Mr : le Professeur KHELIFI. D, pour ses précieux conseils, son aide et de nous avoir accepté au sein de son laboratoire pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier très spécialement M^{elle} MEDOURI. A, pour sa gentillesse et sa très disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour sa grande patience, sa modestie, sa générosité, l'inspiration, l'aide. Acceptes chère tout nos sentiments de gratitude.

Nos remerciements s'étendent également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette recherche en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions : A M^{elle} : BELLIL. I, maître de conférences à l'UFM Constantine, nous vous remercions d'avoir accepté de présider le jury d'évaluation de notre travail, également à Mr. GRAMMA. M, chargé de cours à l'UFM Constantine, nous vous remercions de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à tout le personnel médical du service d'oncologie du CHU de Constantine pour leur collaboration.

Nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

A la mémoire de mon très cher papa

Disparu trop tôt papa j'aurais tant aimé t'avoir à mes côtés et t'entendre me dire BRAVO ma fille. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A la mémoire de mon très chère mama

Disparu trop tôt mama j'aurais tant aimé t'avoir à mes côtés et t'entendre me dire BRAVO ma fille. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A Mon cher frères, karim, mon ange gardien et mon fidèle accompagnant dans les moments les plus délicats de cette vie, pour son affection, compréhension et patience

*A Mon frère ABDERAHIM, qui me comble de joie et de gaieté
Je leur souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

Je leur exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour

A toi ma sœur de cœur Amira

Je t'adore au delà des liens du sang et à jamais

Tu es ma soeur mon amie ma confidente et tu le sais

Rien ne peut nous séparer pas même les frontières du temps

Tu es la chair de ma chair je t'aime très fort

A la mémoire de mon très cher oncle neserdine

Un grand homme symbole de bonté et de tendresse, Que dieu l'ait en sa sainte

A mes tantes Farída et Nadía

*Je vous dédie ce travail en reconnaissance de votre assistance et
affection qui nous ont été capitales.*

*A tous les membres de ma famille, petite et grande
Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon amour
et affection*

A tous mes cousins, amis et tous ceux que j'aime.

Merci d'avoir cru en moi

Imène

Dédicaces

A ma très chère mère RATIBA

Ce travail est le fruit de ton éducation grâce à ton dévouement, ton courage et ta bravoure. Tu m'étais à la fois la mère et le père. Tu étais toujours prête à sécher nos larmes et nous donner de ton courage afin de continuer notre parcours de savoir et aboutir aux fins que tu désirais après cette longue lutte dans la vie.

Qu'Allah le tout puissant, le très miséricordieux te bénisse, Maman chérie, je t'aime.

A la mémoire de mon très cher papa

Disparu trop tôt papa, j'aurais tant souhaité t'avoir dans ces moments à mes côtés pour t'entendre me dire BRAVO ma fille. Je sais que, depuis le monde où tu repose maintenant, fier de ta fille que tu l'as inculqué les premières notions du savoir et de la science, toi papa l'instituteur et l'éducateur des générations.

Que Dieu le Tout Puissant te garde dans son paradis. Papa, je t'aime.

A mes très chères sœurs NAWEL et IKRAME

Vous avez été pour moi mes confidentes. Vos sacrifices pour la réalisation de ce travail me sont inestimables. Vous êtes des sœurs formidables. Que le seigneur resserre nos liens.

A tous mes collègues et mes amies :

Nahla- Naoufel- Nihed- Hiba- Lamia- Chahinez- Amina- Sara- Mebareka

Vos soutiens tant moraux que matériel et vos nombreux sacrifices durant tout mon cycle m'ont permis de venir à bout de ce travail, qu'ils soient le témoignage de ma profonde gratitude. Que Dieu le tout puissant vous bénisse.

Merci d'avoir cru en moi

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
1. Le côlon.....	2
1.1. Anatomie.....	2
1.2. Histologie.....	2
1.3. Fonction.....	3
2. Le cancer du côlon.....	4
2.1. la cellule cancéreuse.....	4
• La cancérogenèse.....	4
• L'oncogène.....	4
• Les anti-oncogènes (gènes suppresseurs de la tumeur).....	4
2.2. Définition du cancer colorectal.....	4
2.3. Epidémiologie.....	5
2.4. Facteurs de risque.....	6
2.4.1. Facteurs héréditaires et génétiques.....	6
2.4.2. Facteurs alimentaires.....	7
2.4.3. Facteurs liés à l'environnement.....	7
2.4.4. Autres facteurs.....	7
2.5. Diagnostic.....	8
3. Les glandes salivaires et la salive.....	8
3.1. Les glandes salivaires.....	8
3.1.1. Les glandes salivaires principales.....	8
a. La glande parotide.....	8
b. La glande sous-maxillaire.....	9

Sommaire

c. La glande sublinguale.....	9
3.1.2. Les glandes salivaires accessoires.....	9
3.2. La salive.....	9
3.2.1. Composition biochimique de la salive.....	9
a. Eau.....	9
b. Les constituants inorganiques.....	10
c. Les protéines salivaires.....	10
• Les protéines extrinsèques.....	10
• Les protéines intrinsèques.....	10
d. Autres constituants organiques.....	11
3.2.3. Caractéristiques physicochimiques de la salive.....	11
a. Le volume.....	11
b. Le PH.....	11
c. Le pouvoir tampon.....	11
d. Le débit salivaire.....	12
3.2.4. Formation de la salive.....	12
3.2.5. Rôle de la salive.....	12
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	
I. Matériel biologique.....	14
1. Recrutement des Patients.....	14
2. Recueil de la salive.....	14
II. Techniques d'électrophorèse.....	14
1. Extraction des protéines.....	14
2. Electrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE.....	15

Sommaire

2.1. Préparation des gels.....	15
2.2. Migration électrophoretique.....	15
2.3. Fixation, coloration, décoloration.....	16

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Analyse des profils électrophorétiques.....	17
1.1. Analyse des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	17
1.2. Analyse des protéines salivaires dénaturées et non réduites.....	18
2. Etude de la variabilité des protéines salivaires.....	19
2.1. En condition dénaturante et réductrice.....	
2.1.1. Etude des protéines salivaires de HPM.....	19
2.1.2. Etude des protéines salivaires de FPM.....	20
2.2. En condition dénaturante e non réductrice.....	22
2.2.1. Etude des protéines salivaires de HPM.....	22
2.2.2. Etude des protéines salivaires de FPM.....	24
3. Classification hiérarchique des protéines salivaires.....	25
3.1. Classification des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	25
3.2. Classification des protéines salivaires dénaturées et non réduites.....	27
4. Indice de similarité des diagrammes protéiques.....	28
4.1. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	28
4.2. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites.....	29
Conclusion	31
Références bibliographiques	33

Annexes

Introduction

Le cancer du côlon résulte de l'accumulation de mutations dans différents gènes au sein des cellules constitutives de la couche la plus interne de la paroi colique appelée « muqueuse » (32). Ces mutations sont responsables de la prolifération excessive et anarchique de ces cellules qui aboutit à la formation de petites tumeurs initialement bénignes appelées « adénomes » ou « polypes adénomateux » (17). Ces derniers peuvent se transformer secondairement en tumeurs malignes (également appelées adénocarcinomes) qui ont la capacité d'infiltrer progressivement l'épaisseur de la paroi colique puis de diffuser à distance du côlon pour donner naissance à des métastases (32, 34).

Le cancer du côlon est le 3^{ème} type du cancer le plus répandu dans le monde (24). Dans les pays développés, il a une cause de mortalité importante. Il constitue 10 % des décès par cancer après les cancers du poumon et de la prostate chez l'homme, du sein chez la femme (21).

En Algérie, le cancer colique est classé en troisième position, après le cancer du poumon et de la vessie, chez l'homme et le cancer du sein et du col utérus, chez la femme (4).

En effet, l'incidence de ce cancer est largement plus élevée dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (24), son pronostic est généralement mauvais, du fait d'un diagnostic tardif et de possibilités thérapeutiques, adjuvantes à la chirurgie, restreintes. Le taux de survie après intervention chirurgicale ne dépasse pas 50 % à 5 ans. Le risque de cancer colorectal cumulé au cours de la vie est de 5 %. Il augmente avec l'âge et, comme pour la plupart des cancers à développement tardif, il est faible avant 50 ans. L'âge moyen au diagnostic est de 65 ans (21).

Il semble utile de faire le point sur la salive en étant un liquide biologique reflétant la composition protéique sanguine. La salive peut être une issue de recherche de biomarqueurs pour certaines maladies et dont le rôle a été déjà établi dans certaines maladies ; tels que la maladie d'Alzheimer et le diabète avec ses deux types (30).

L'objectif de cette étude est d'investiguer et explorer le protéome salivaire des patients atteints du cancer colorectal par application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle pour la recherche de biomarqueurs salivaires.

La première partie de ce travail comprend une synthèse bibliographique, la deuxième partie présente les patients, le matériel et les méthodes utilisées et enfin les résultats et leur interprétation sont présentés dans la troisième partie.

1. Le côlon

1.1. Anatomie

Le côlon ou gros intestin est la partie terminale du tube digestif. Il fait suite à l'intestin grêle ou petit intestin et se termine par le rectum (28). Dans son ensemble, le côlon forme un cadre qui entoure la cavité abdominale et les anses grêles. Sa longueur est de 1 à 1.50 m en moyenne et son diamètre beaucoup plus important que l'intestin grêle (9).

Il comprend successivement, dans le sens du flux fécal (Figure1) :

-**Le caecum** : qui fait la jonction avec la fin de l'intestin grêle. Situé en dessous de l'abouchement de l'iléon et auquel est rattaché l'appendice, le caecum a le plus grand diamètre (environ 7,5 à 8,5 cm) (3).

-**Le côlon ascendant** : qui remonte verticalement jusqu'au foie par un angle appelé l'angle colique droit.

- **Le côlon transverse** : qui s'étend de l'angle colique droit à l'angle colique gauche.

-**Le côlon descendant** : qui descend de l'angle gauche au niveau du bassin, et se termine par le côlon sigmoïde.

-**Le côlon sigmoïde** : il se présente sous forme d'un S d'où son nom dérivé de la lettre grecque sigma. Il est situé avant la jonction avec le rectum.

-**Le rectum** : c'est la partie terminale qui a environ 8cm de long. Situé dans le petit bassin en avant du sacrum, il suit le gros intestin et se termine par l'anus.

-**L'anus** : est le point de sortie du côlon il est formé d'un sphincter anal interne à motricité involontaire et un anneau externe à motricité volontaire (3).

1.2. Histologie du côlon

La paroi du gros intestin comprend les quatre caractéristiques du tube digestif, mais ne contient ni valvules conniventes, ni villosités intestinales (5).

1.2.1. La muqueuse

Lisse, constituée surtout de cellules caliciformes particulièrement abondantes et d'entérocytes. Les glandes de Lieberkühn sont longues et fréquemment ramifiées à leurs extrémités profondes. Le chorion, très dense, est infiltré de nombreux nodules lymphoïdes (5 et 19 et 21). La musculaire mucosae est mince (figure 2).

1.2.2. La sous muqueuse

Possède des soulèvements macroscopiques permanents (de l'ordre du centimètre) qui constituent les « valvules conniventes » (22).

1.2.3. La musculuse

Est très développée, caractérisée par trois bandelettes qui s'étendent sur toute sa longueur, et qui sont à l'origine des bosselures caractéristiques du gros intestin (22 et 28).

1.2.4. La séreuse

Péritonéale du côlon forme, au niveau de la portion transverse, une partie du péritoine appelée méso côlon(19). Celui-ci contient des éléments vasculaires, lymphatiques et des troncs nerveux. L'artère mésentérique supérieure assure la vascularisation du caecum, du côlon droit et l'hémi côlon transverse. L'artère mésentérique inférieure effectue la vascularisation de la moitié gauche du côlon (2 et 5).

1.2. Fonction

Le gros intestin possède, au premier chef, des fonctions de motricité, mais il reste encore impliqué dans les fonctions digestives (absorption, sécrétion, dégradation des aliments). Il participe à la défense immunitaire de l'organisme.

- **Fonction de motricité** : celles-ci constituent surtout dans le stockage et le brassage des matières alimentaires et se traduisent par des mouvements de contraction segmentaire (26).

- **Fonction d'absorption** : il s'agit principalement de la réabsorption d'eau, de sodium, de vitamines et de sels minéraux, le transport du sodium est actif ce qui provoque un mouvement d'eau selon un gradient osmotique. Cette réabsorption est surtout faite au niveau

des anthérocytes de côlon droit et joue un rôle majeur dans l'équilibre hydro-électrolytique de l'organisme (19).

• **Fonction de sécrétion** : la sécrétion exocrine concerne le mucus des cellules caliciformes qui permet la protection de la muqueuse vis-à-vis de matières fécales qui deviennent de plus en plus solides (22).

• **Fonction de digestion** : la dégradation des matières alimentaires ayant échappées à l'absorption intestinale est assurée par la flore bactérienne du côlon(26).

2. Le cancer du côlon

2.1. La cellule cancéreuse

Une cellule cancéreuse est une cellule dont la division n'est plus contrôlée et qui a perdu le plus souvent tout ou partie de spécialisation(25). On dit qu'elle se différencie. La cellule cancéreuse se caractérise par l'activation permanente et autonome de la prolifération n'importe quel nouvel environnement cellulaire et tissulaire, ce qui fait que le cancer peut affecter tous les types cellulaires du corps(2). L'un des cancers les plus répandus est le cancer colorectal. Il affecte le côlon et le rectum puisqu'ils sont du même type histologique. Alors, pour en parler globalement, on utilise le terme cancer colorectal (11).

2.2. Définition du cancer colorectal

Le cancer colorectal est un cancer siégeant dans la région du côlon et du rectum (partie terminale du côlon) caractérisé par une prolifération anormale de cellules dans le gros intestin et par la formation de carcinomes glandulaires ou adénocarcinomes (4 et 8). La tumeur pénètre alors en profondeur et peut atteindre successivement les différentes couches de la muqueuse colique jusqu'au péritoine qui l'enveloppe, puis les ganglions lymphatiques (Figure 3). La progression se fait par accumulation des mutations de gènes au sein des cellules provoquant divers stades d'adénome, puis d'adénocarcinomes. Lors de la transformation maligne, la prolifération peut suivre deux voies (15 et 17):

- *La voie lymphatique* (par la circulation de la lymphe) : les ganglions sont atteints selon la localisation des lésions primaires.

- *La voie hématogène* (par la circulation sanguine) dont les deux premiers organes atteints sont le foie et /ou poumons (22).

• La cancérogenèse

La formation du cancer, ou cancérogenèse, correspond à la prolifération désordonnée de cellules d'un tissu ou d'un organe. La plus part des cellules de notre organisme sont en renouvellement constant. Il existe donc des mécanismes biologiques qui empêchent que cette prolifération normale ne soit excessive (2).

• L'oncogène

On désigne par oncogène des gènes dont il a été démontré expérimentalement qu'une expression anormale puisse conduire à l'acquisition du phénotype tumoral (perte du control de la multiplication et la position des cellules au sein d'un tissu) (2).

• Les anti-oncogènes (gènes suppresseurs de la tumeur)

A l'état normale, il existe un équilibre entre l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. Des mutations successives de ces gènes rompent cet équilibre, entraînant une prolifération excessive des cellules tumorales (2).

2.3. Épidémiologie

2.3.1. Fréquence

Le cancer du côlon est le 3^{ème} type de cancer le plus répandu dans le monde avec 945.000 cas et 492.000 décès par an (OMS). L'incidence de ces cancers est largement plus élevée dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (29).

2.3.2. Âge et sexe

Le cancer colique est rare avant 50 ans (6 % des cas). L'incidence augmente ensuite rapidement avec l'âge. La proportion des cas diagnostiqués double chaque décennie entre 40 et 70 ans dans les deux sexes. L'âge moyen au diagnostic est de 69,5 ans chez l'homme et 72,8 ans chez la femme. L'augmentation de l'incidence du cancer colique pourrait être liée au vieillissement de la population. On note une légère prédominance masculine, avec un sex-ratio de 1,5(4).

En Algérie, chez l'homme, la prévalence a été de 1180 cas soit 7,1% après le cancer du poumon. Chez la femme, la prévalence a été de 1082 soit 7,1% après le cancer du sein et du col utérin (4 et 25).

Chez l'homme, le cancer du côlon-rectum se situe au troisième rang des cancers incident masculins avec 21 500 nouveaux cas estimés en 2011 loin derrière le cancer de la prostate (71 000) et le cancer du poumon (27 500). Il représente 10,4 % de l'ensemble des cancers incidents masculins. Chez la femme, il se situe au deuxième rang (19 000 cas) derrière le cancer du sein (53000). Il représente 12 % de l'ensemble des cancers incidents féminins (24).

2.4. Facteurs de risques

Une meilleure connaissance de facteurs prédits aux cancers recto colique, devrait permettre d'améliorer leur prévention et rendre leur dépistage plus précoce.

2.4.1. Facteurs héréditaires et génétiques

a. Sujets à risque très élevé de cancer colique

Dans environ 5 % des cas, le cancer colique survient dans un contexte de maladies héréditaires prédisposant au cancer colique, à transmission autosomique dominante et à pénétrance élevée. Un âge inférieur à 50 ans lors du diagnostic, des antécédents tumoraux personnels, une agrégation familiale de cancers, doivent faire évoquer une prédisposition familiale et reconstituer l'arbre généalogique du sujet. La polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch ou HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) sont les deux maladies associées aux gènes majeurs de susceptibilité du cancer colorectal actuellement identifiées(27).

• *Polypose adénomateuse familiale*

Moins de 1 % des cancers colorectaux seraient imputables à la polypose adénomateuse familiale, qui se caractérise par le développement, après la puberté, de plusieurs centaines d'adénomes intestinaux(8). Elle se manifeste aussi, chez environ 70 % des sujets, par une hypertrophie de l'épithélium pigmentaire de la rétine(12). Les autres manifestations extracoliques les plus graves et les plus fréquentes sont les tumeurs desmoïdes, les adénomes duodénaux. La transformation maligne est inéluctable si une coloproctectomie totale n'est pas faite au début de l'âge adulte. Les techniques de génétique moléculaire permettent d'identifier sur les leucocytes du sang circulant les sujets atteints de mutation constitutionnelle du gène *APC*. Le phénotype et donc la sévérité de la maladie varient en fonction du siège précis de la mutation causale(8 et 12).

• *Syndrome HNPCC ou syndrome de Lynch*

Près de 5 % des cancers colorectaux surviendraient dans le cadre d'un syndrome de Lynch (8 et 11). Ils surviennent vers 40 à 50 ans (27).

b. Sujets à risque élevé du cancer colique

En dehors des colites inflammatoires, il s'agit des sujets aux antécédents personnels et familiaux d'adénome et d'adénocarcinomes colorectaux (12).

• *Antécédent personnel et familial de cancer colorectal*

Les sujets ayant un ou plusieurs parents du premier degré (pères, mères, frères, soeurs, enfants) atteints d'un cancer colorectal ont un risque d'être atteint de ce cancer plus

élevé que ceux de la population générale. 15 à 20% des patients qui ont développé un cancer présentent un parent de premier degré ayant aussi développé cette pathologie: il semble que le risque soit multiplié environ par 2 par rapport à la population générale (12).

c. Sujets à risque moyen

Le cancer du côlon étant rare avant 50 ans et l'incidence augmentant rapidement avec l'âge, les sujets de plus de 50 ans des 2 sexes sont considérés comme la population à risque moyen (8 et 11).

2.4.2. Facteurs alimentaires

Les facteurs nutritionnels qui augmentent les risques de cancer colorectal sont :

- * Les régimes riches en protéines, en particulier les régimes riches en viandes rouges
- * Les régimes trop riches en graisses, surtout celles d'origines animales.
- * D'autres facteurs nutritionnels sont par contre plutôt protecteurs :

✓ Les fibres alimentaires, contenues essentiellement dans les légumes tels que les légumes verts...etc.

- ✓ Les vitamines, en particulier A, C, D, et E (12 et 34).

2.4.3. Facteurs liés l'environnement

Ils sont suggérés devant par la prédominance de l'affection dans les pays occidentaux : Europe, états Unis d'Amérique, alors qu'elle est rare en Afrique (12).

2.4.4. Autres facteurs

➤ **Alcool** : plusieurs études ont montré un lien entre la consommation d'alcool et le cancer du côlon, identique pour les hommes et pour les femmes (12). Les personnes à risque ont tout avantage à réduire leur consommation, sans quoi il serait indiqué de prendre des suppléments d'acide folique; quelques recherches ont en effet démontré que les méfaits de l'alcool seraient partiellement contrés par cette mesure (11).

➤ **Tabac** : il faut tenir compte, non seulement de l'intensité du tabagisme (nombre de cigarettes par jour), mais surtout la durée de l'intoxication tabagique (24).

➤ **Manque de fer** : l'anémie résultant d'une déficience en fer accroît les risques de développer ce type de cancer (11).

2.5. Diagnostic du cancer colorectal

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Lorsqu'une personne présente des symptômes d'un cancer colorectal ou une anomalie est décelée lors d'un examen médical (test de dépistage, coloscopie), un certain nombre d'examen doivent être réalisés afin d'établir un diagnostic. Généralement, deux étapes sont nécessaires pour obtenir un diagnostic précis et complet du cancer colorectal(17) :

Examen clinique se fait par :

- *Le toucher rectale* : qui permet de diagnostiquer un cancer du rectum s'il est situé à moins de 8 cm de l'anus(12).
- *La sigmoidoscopie* : on introduit dans le gros intestin un tube creux pourvu d'une lumière pour faire un examen visuelle du rectum.
- *La coloscopie* : réalisée sous brève anesthésie générale, la coloscopie permet de visualiser les parois internes du côlon(17).

Examen biologique se fait par :

- *Analyse sanguine* : ce test permet de déceler l'anémie que présente bien des personnes atteintes de cancer colorectal en raison des saignements occultes prolongés qui sont provoqués par les tumeurs (12).
- *Le dosage des marqueurs tumoraux* : le dosage des marqueurs tumoraux (ACE et CA 19.9) se fait dans le bilan initial ce qui permettra de suivre l'efficacité du traitement et de déceler en cas d'ascension du marqueur, une rechute ou la présence de métastase (12 et17).

3. Les glandes salivaires et la salive

3.1. Les glandes salivaires

Les glandes salivaires sont annexées à la cavité buccale et sécrètent la salive, elles sont donc dites exocrines (13 et14), Il existe deux types :

3.1.1. Les glandes salivaires principales

Elles sont représentées par trois paires de glandes majeures (Figure 4):

a. La glande parotide

C'est la glande salivaire la plus volumineuse, environ 32 cm². Elle est située devant l'oreille, sur le côté du visage. Elle se situe dans la loge l'oropharynx (7).

b. La glande sous-maxillaire

Elle est plus petite que la glande parotide. Elle est située derrière la mâchoire inférieure, juste sous le menton et la langue. Cette glande ovalaire de 2,5 cm sur 1,5cm (**6 et 7**).

c. La glande sublinguale

C'est la plus petite des glandes salivaires principales, elle pèse environ 3 g et fait 3 cm de longueur, et 7 à 8 mm de largeur, de forme allongée, aplatie transversalement. Elle est située dans la partie antérieure du plancher de la bouche (**9 et 16**).

3.1.2. Les glandes salivaires accessoires

Ces glandes dites mineures sont très nombreuses et disséminées sur toute la surface de la muqueuse buccale, excepté au niveau des gencives, du vermillon des lèvres et de la partie antérieure du palais osseux. Il s'agit de petites formations glandulaires muqueuses et plus rarement séreuses de 1 à 2 mm de diamètre. Ces glandes quantité de salive négligeable par rapport au volume total salivaire (**7, 10 et 28**).

3.2. La salive

La salive est la première sécrétion digestive, elle désigne un liquide physiologique incolore alcalin, légèrement visqueux sécrété par les glandes salivaires. Il existe plusieurs types de salives comme la salive parotidienne, salive sous sublinguale et bucco-labiale, mais encore une salive mixte constituée d'un mélange des premières dans la cavité buccale (**13**).

3.2.1. Composition biochimique de la salive

On peut définir dans la sécrétion salivaire : des constituants inorganiques ; anionique et cationiques dont les plus importants sont les ions bicarbonates et phosphates ainsi que des constituants organiques qui confèrent à la salive de nombreuses propriétés (**13**).

a. Eau

L'eau constitue 99 % de la salive dont le rôle est l'humidification du bol, la solubilisation des substances ce qui permet de détecter le goût.

b. Les constituants inorganiques

La salive contient des constituants ioniques (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-) dont la composition varie pendant la sécrétion. Certains de ces ions permettent de réguler le pH du milieu buccal et qui ont une action bactériostatique(13).

c. Les protéines salivaires

Les protéines salivaires représentent la majeure partie des constituants organiques. On distingue les protéines extrinsèques issues du sérum et les protéines intrinsèques, synthétisées par la glande(13).

• Les protéines extrinsèques

On trouve parmi les protéines extrinsèques les immunoglobulines. L'IgA monomérique, qui est la plus représentée, dérive du sérum et gagne la cavité buccale de façon transépithéliale ou par le fluide gingival. On trouve également des IgG et des IgM. Des albumines issues du sérum sont également détectées dans la salive (18).

• Les protéines intrinsèques

✓ L' α amylase

L'amylase est une enzyme protéique de la famille des hydrolases, catalysant principalement l'hydrolyse de l'amidon en le clivant en maltose un disaccharide fait de deux molécules de glucose. Elle est produite par les glandes salivaires et les glandes pancréatiques(18).

✓ La lipase linguale

La lipase linguale est une enzyme salivaire sécrétée par des glandes de la langue et qui est impliquée dans la digestion des lipides. Elle Hydrolyse les triglycérides et libère des acides gras à longue chaîne (AGLC) dans la salive (18).

✓ Les mucines

Les mucines sont des glycoprotéines du mucus, responsables des propriétés viscoélastiques et gélifiantes de celui-ci. Le caractère visqueux, facilite l'ingestion du bol alimentaire en l'imprégnant. Les mucines sont capables d'interagir avec des microorganismes en les agglutinant. Elles participent à la protection des muqueuses(13 et 18).

✓ Le lysozyme

C'est une protéine globulaire formée de 129 acides aminés (chez l'être humain) retrouvée dans la plupart des sécrétions de l'organisme (salivaires, lacrymales, nasales, bronchiques). Dans la salive, elle représente près de 10% des protéines totales. Le lysozyme a une action anti bactérienne importante dans la salive. Il hydrolyse les liaisons β -(1-4) entre acide N-acetyl muramique et N-acetyl glucosamine (13).

d. Autres constituants organiques

- Des facteurs de croissance : EGF et NGF (substances à activité humorale dans les glandes salivaires).

- Des IgA sécrétoires dont la production peut être induite après stimulation du système lymphoïde annexé au système digestif.

- Des lipides qui peuvent jouer un rôle important en se liant à des protéines salivaires (18).

3.2.2. Caractéristiques physicochimiques de la salive

a. Le volume

D'une personne à l'autre, la sécrétion peut varier de 500 à 1200 ml par jour, 70% d'origine parotidienne, 20 % sub mandibulaire (la production des autres glandes étant relativement négligeable)(19).

b. La viscosité

La viscosité salivaire est le reflet du taux de mucines. Elle varie selon la localisation du prélèvement et le débit salivaire(19).

c. Le pH

Il exprime l'acidité ou l'alcalinité de la salive et varie en fonction de l'âge, du lieu de prélèvement buccal et de l'alimentation. Le pH physiologique d'un individu varie dans une gamme normale comprise entre 5, 6 et 7 avec une valeur moyenne d'environ 6, 7 (7).

d. Le pouvoir tampon

La salive possède un pouvoir tampon qui est essentiellement assuré par les phosphates, les bicarbonates et certaines protéines. Le pouvoir tampon de la salive augmente avec la stimulation il est presque inefficace pendant les périodes de faible débit (le pH salivaire peut descendre alors à un niveau de 5,3) (1).

e. Le débit salivaire

Il reflète la production quantitative de la salive. Il est sous l'influence de multiples facteurs tels que le degré d'hydratation, la position du corps, l'exposition à la lumière, les stimulations antérieures, les rythmes circadien et circannuel, la taille des glandes et les médicaments ou drogues. Le débit salivaire augmente avant le repas alors qu'il est très réduit lors du sommeil, la déshydratation et le stress réduisent aussi le débit (21 et 7).

3.2.3. Formation de la salive

A partir des capillaires sanguins environnants, les cellules acineuses pompent activement Na^+ et Cl^- et permettent le libre passage de l'eau entraînant la formation de la salive primaire (Figure 5). Les cellules muqueuses libèrent des mucines et les cellules séreuses sécrètent plusieurs protéines incluant des protéines riches en proline et des enzymes (22). Il y a donc une excrétion des protéines et une ultra filtration ionique (Figure 5). La seconde phase s'effectue lors du passage de la salive primaire dans le canal strié où elle est modifiée par une sécrétion et une réabsorption d'électrolytes, conduisant à la formation de la salive finale, hypotonique au plasma (21 et 22). Il y a une réabsorption sodique massive au niveau des cellules des canaux excréteurs intra lobulaires et un enrichissement en potassium grâce au fonctionnement d'une pompe à $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ des cellules des canaux striés (Figure 6). De plus des plasmocytes sécrètent des IgA qui gagnent la lumière de l'acinus (16 et 33).

3.2.4. Rôle de la salive

La salive joue un double rôle d'humidification des muqueuses et de préparation des aliments pour leur digestion, ainsi que d'autres fonctions de protection et de cicatrisation (21).

• Fonction digestive

Les enzymes salivaires participent au premier stade de la digestion. L'action de l'amylase est optimale à pH 7. Elle débute la digestion des polysaccharides de l'alimentation (19 et 22).

• **Fonction de protection**

La salive est la cause essentielle de la très grande résistance de la cavité buccale à l'infection. Son action est aussi bien physique, car elle permet l'auto-nettoyage de la cavité buccale et l'humidification des muqueuses, qu'antibactérienne par la présence de lysozyme, et d'immunoglobulines(19, 21 et 22).

• **Fonction de cicatrisation**

La salive contient des facteurs de croissance qui interviennent dans la cicatrisation des tissus. On trouve notamment EGF. La salive a également une fonction mécanique qui nous permet de goûter, de mastiquer et déglutir les aliments solides. Elle agit comme un solvant et un lubrifiant dont les qualités physiques sont améliorées par la présence de mucine (1).

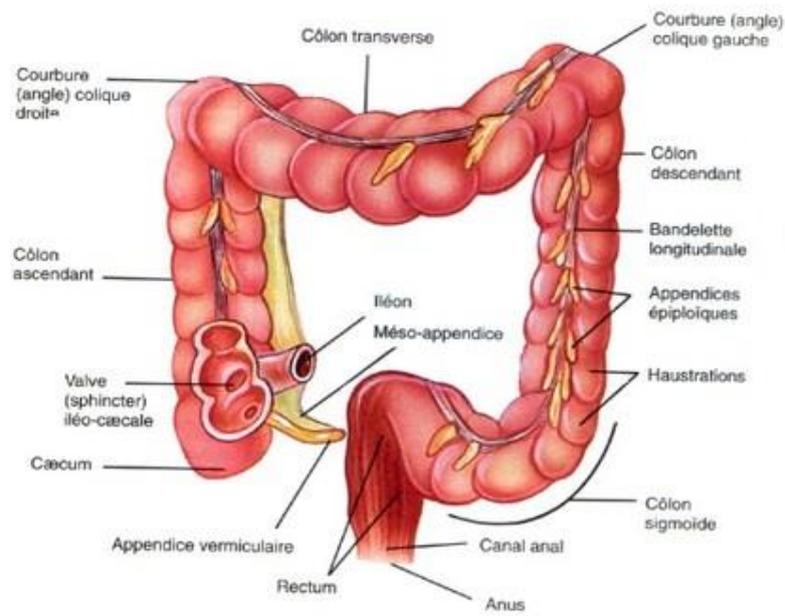


Figure 1 : Anatomie du colon (10)

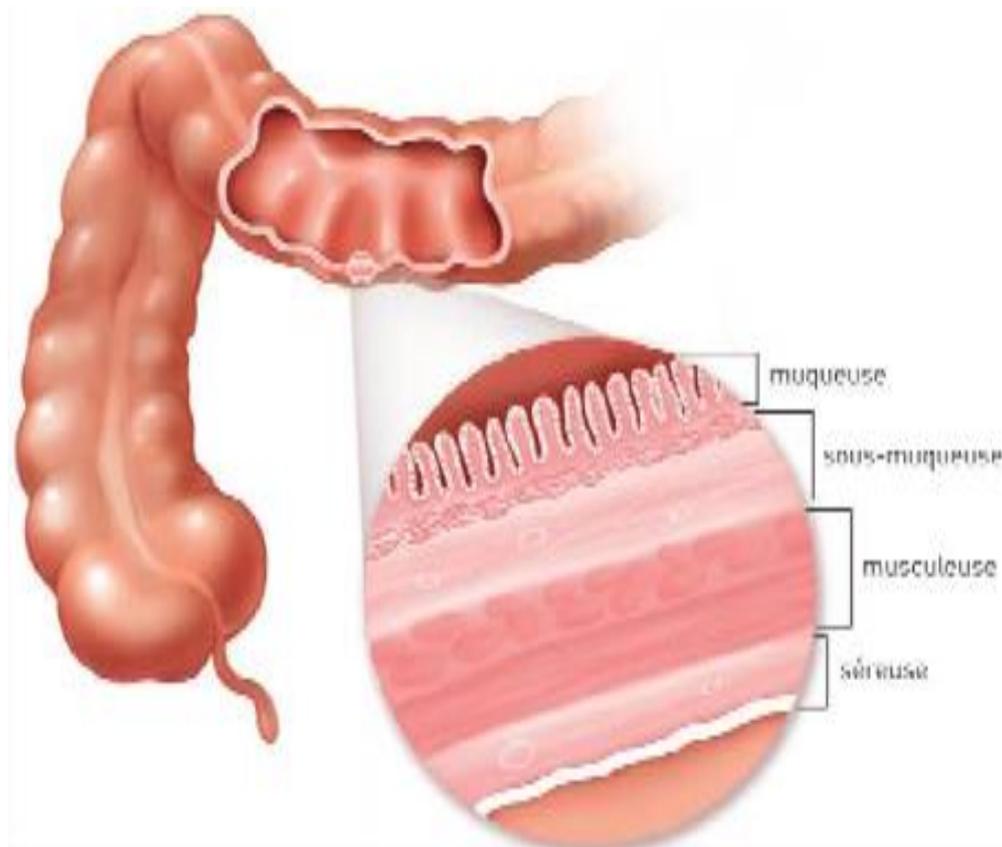


Figure 2 : La paroi du gros intestin (10)

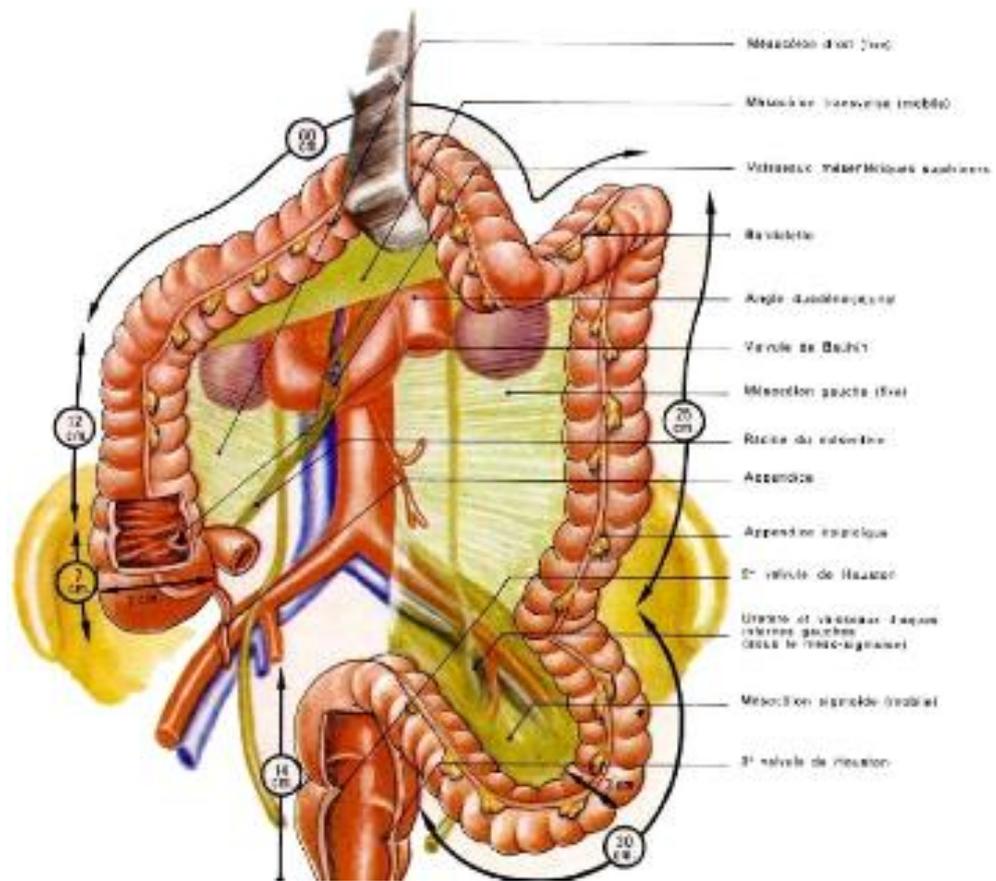


Figure 3 : Cancer du côlon (15)

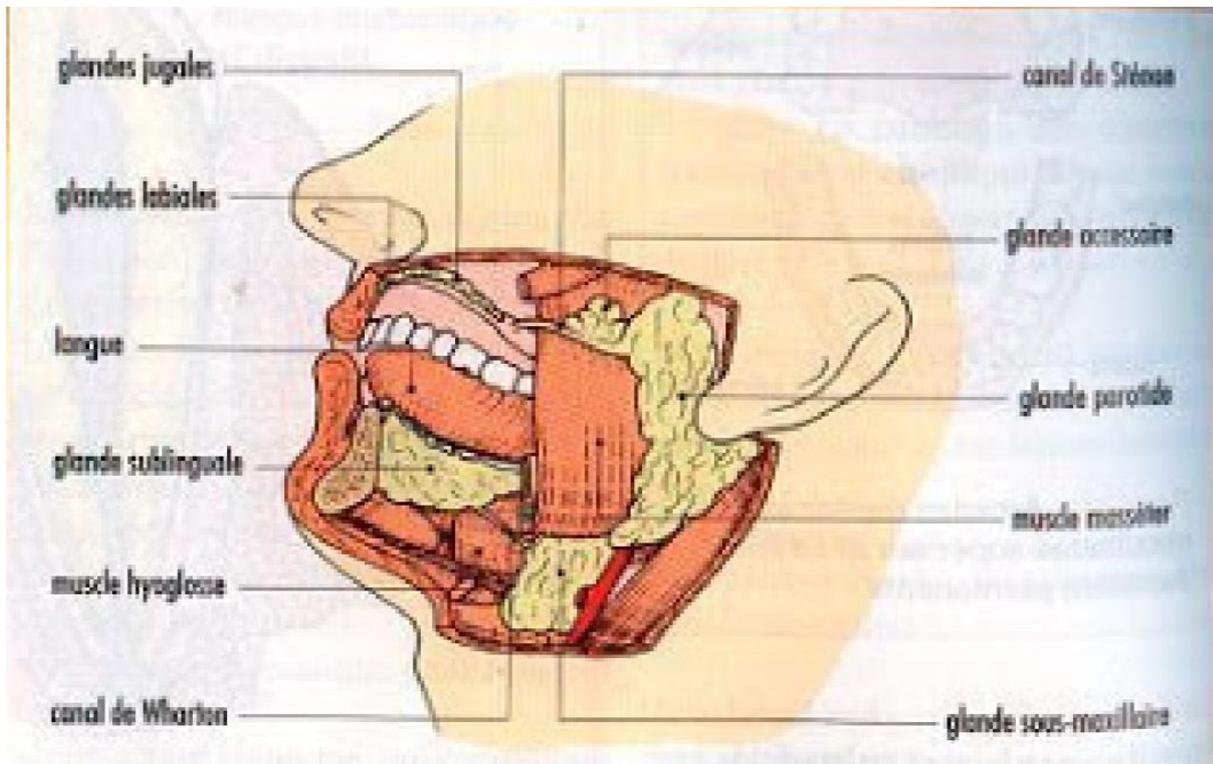


Figure 4: Localisation des trois paires de glandes (26)

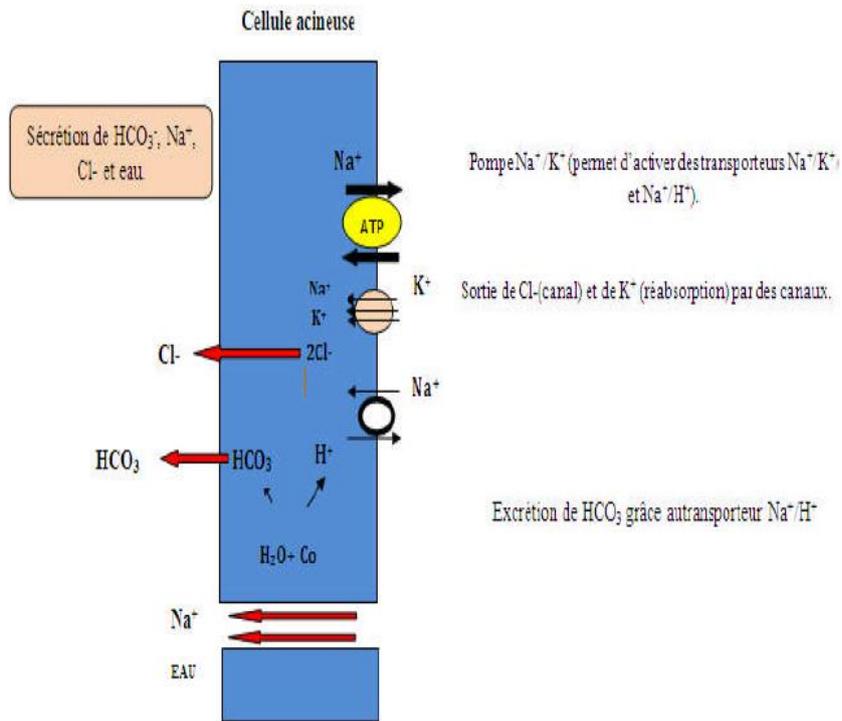


Figure 5: Formation de la salive primaire (7)

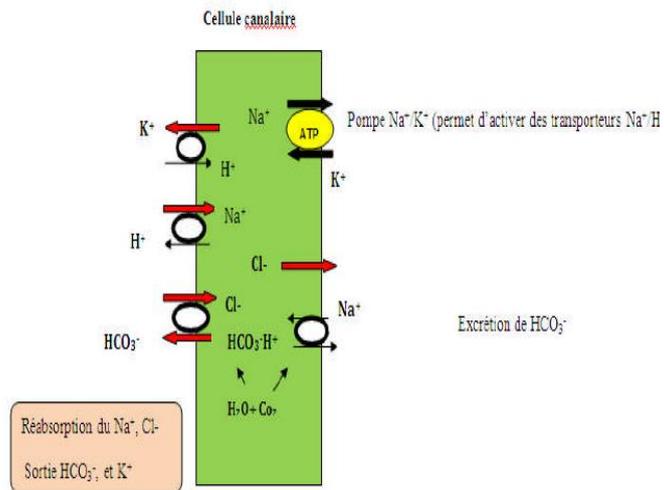


Figure 6: Mécanisme de formation de la salive définitive (7)

Chapitre 1 : Matériels et Méthodes

I. Matériel biologique :

1. Recrutement des patients :

Notre étude a porté sur 29 patients ayant un cancer colorectal provenant du service d'Oncologie Médicale du CHU de Constantine. Les patients recrutés sont âgés entre 32 et 64 ans dont la pathologie est au stade initial ou avancé. Cette population a été comparée à deux sujets sains, sans pathologies connues et possédant une bonne hygiène buccale.

2. Recueil de la salive :

Pour le recueil de la salive nous avons adopté la méthode décrite par Hirtz et *al.*, 2005 avec quelques modifications. La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner (environ 10 heures du matin) après que le patient se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice. Afin de favoriser la salivation, le patient doit boire un verre d'eau 15 minutes avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de para film (environ 3 cm²), pendant quelques minutes. Trois ml de salive totale sont ainsi prélevés dans des tubes eppendorf stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 x g pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines et les débris cellulaires et alimentaires encore présents dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé (-20°C) jusqu'aux analyses.

II. Techniques d'électrophorèse :

1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de la salive des patientes malades et des sujets sains obtenue après centrifugation de la salive totale. Les protéines salivaires sont solubilisées dans une solution d'extraction à base de Tris-HCl 0.062M pH 6.8, 2% SDS (p/v), 10% glycérol (v/v), 0.01% bleu de bromophenol (p/v) et 2.5% β -mercaptoéthanol (v/v). Une incubation de 30 min à 65°C est réalisée.

Chapitre 1 : Matériels et Méthodes

2. Electrophorèse mono dimensionnelle SDS-PAGE :

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par Laemelli (1970) modifiée par Singh et al, (1991). La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu, en présence d'un détergent anionique, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

2.1. Préparation des gels :

Le support d'électrophorèse est formé d'un gel de séparation (separating gel) à T =12.58% et C =0.97%, et d'un gel de concentration (stacking gel) à T=2.88% et C=1.42%. Ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 35% (p/v), de N, N'- méthylène bis-acrylamide à 2% (p/v), du SDS à 10% (p/v) et de Tris-HCl 1M, tamponnés à pH 8.8 pour le gel de séparation, et à pH 6.8 pour le gel de concentration. Ces deux gels sont polymérisés en présence du TEMED et de l'APS.

Le gel de séparation est préparé le premier, bien mélangé puis coulé entre deux plaques en verre, en laissant un vide de 4cm pour le stacking gel. Une fine couche du butanol est ajoutée pour niveler le gel et pour le protéger de l'air. La polymérisation s'effectue à une température ambiante pendant environ 45 minutes. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé, et des peignes à 15 puits sont rapidement insérés.

Après la polymérisation du stacking gel qui s'effectue en plus de 60 minutes, les peignes sont enlevés en obtenant ainsi des puits servant pour les dépôts des extraits protéiques. Les puits sont remplis avec du tampon de migration avant le dépôt des échantillons.

2.2. La migration électrophorétique :

Après le dépôt des différents échantillons, la cuve d'électrophorèse (bac inférieur) est remplie à un niveau suffisant avec le tampon d'électrophorèse. Ensuite, le bac supérieur situé dessus des deux plaques (bien serré contre les joints pour éviter les fuites) est rempli lui aussi avec le même tampon (tampon de migration). Ensuite, le montage est placé dans la cuve d'électrophorèse pour que les faces inférieures des gels plongent dans le tampon (bac inférieur). Enfin, la cuve est fermée et reliée à un générateur qui va assurer le passage du courant électrique. Le gel de dimension 180x160x1.5 mm est soumis à une intensité constante de 40 mA/gel, et une tension ne dépassant jamais la maximale de 1200 passage du courant électrique. Le gel de dimension 180x160x1.5 mm est soumis à une intensité constante de 40 mA/gel, et une tension ne dépassant jamais la maximale de 1200v. La cuve d'électrophorèse

Chapitre 1 : Matériels et Méthodes

est maintenue à une température constante à 4°C grâce à un système de refroidissement. Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont séparées selon leur encombrement moléculaire. La migration est arrêtée après la sortie du front de migration.

2.2. Fixation, coloration et décoloration :

Après la sortie du front de migration, le gel de concentration est éliminé, et le gel de séparation est démoulé et mis dans des bacs contenant une solution composée d'un agent fixateur des protéines, le TCA (acide trichloracétique) à 60%, ainsi qu'un produit colorant, le bleu de Coomassie R250 à 1% (p/v), les bacs sont mis en agitation pendant 24 heures. Le gel est ensuite décoloré en le plaçant dans l'eau du robinet pendant toute la nuit.

III. Analyse des gels et étude statistique :

1. Analyse des gels :

Il s'agit d'une lecture biochimique qui consiste à déterminer le poids moléculaire de la bande considérée comme bio marqueur et à révéler la mobilité de chaque bande décelable dans le gel. Le traitement des données d'électrophorèse fait appel au calcul des indices de similarité.

2. Indice de similarité

L'indice de similarité (ou indice de ressemblance) des diagrammes a été calculé selon la méthode de Dedio et *al.*, 1969, en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un, au moins, des diagrammes des échantillons comparés. L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes entre les deux diagrammes.

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

On considère qu'une bande n'est pas significativement différente d'une autre lorsqu'elles sont de même mobilité et/ou qu'elles ne se distinguent pas par au moins deux classes de concentration. Les indices de similarités ont été calculés entre les 29 diagrammes des patients.

1. Analyse des profils électrophorétiques

La technique adoptée pour l'analyse est celle décrite par Laemmli (1970) et modifiée par Singh et *al.*, 1991 qui a été utilisée pour fractionner les protéines salivaires. Cette technique permet d'obtenir l'ensemble des protéines. En effet les bandes bien distinctes sont le résultat de l'étape de réduction des protéines par le β -mercaptoéthanol, cette réduction empêche les chaînes peptidiques de se relier par les ponts disulfures, et la dénaturation des protéines par le SDS qui masque la charge intrinsèque de la protéine et qui empêche de reformer la protéine native. La lecture des diagrammes consiste à révéler la mobilité de chacune des bandes protéiques en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation.

1.1. Analyse des protéines salivaires dénaturées et réduites

Les diagrammes électrophorétiques des 31 échantillons (29 malades et 2 témoins) analysés renferment de 4 à 21 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires avec des mobilités allant de 37 à 133 mm (Figure 7).

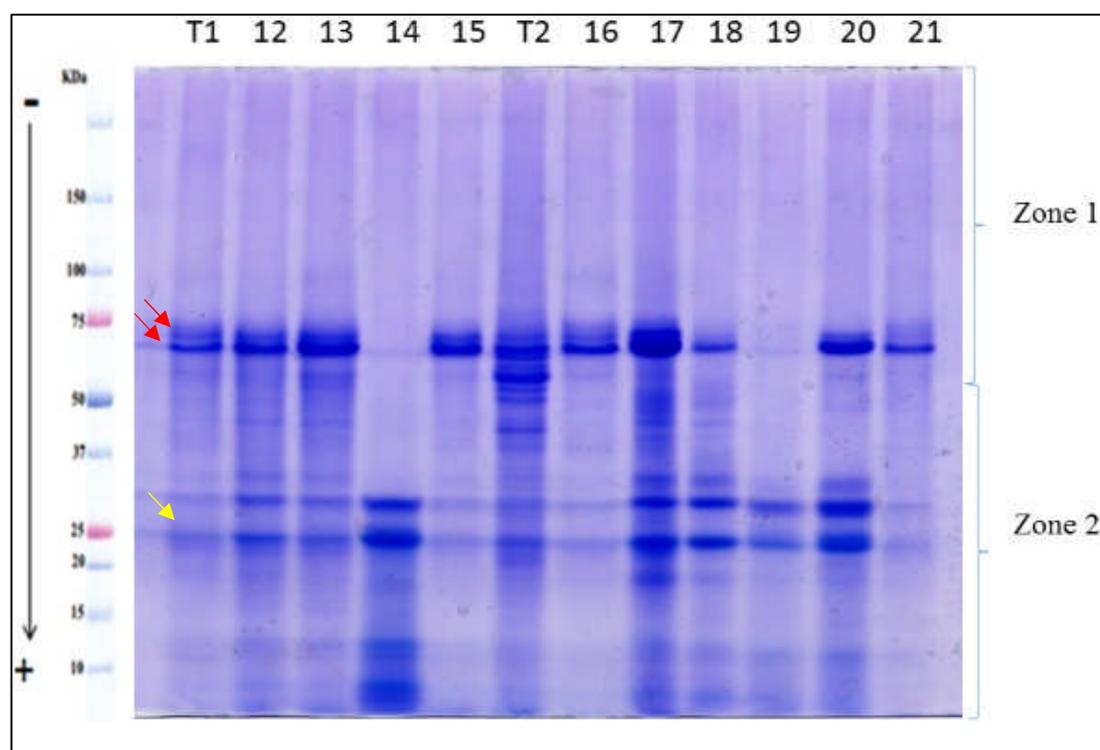


Figure 7: Fractionnement des protéines salivaires dénaturées et réduites par SDS-PAGE. T1 et T2 : témoins : 12 à 21 : des patients.

Les diagrammes sont lus par zone. Nous dénombrons 24 bandes protéiques de mobilités différentes qui se répartissent comme suit : 12 bandes protéiques dans la zone 1

et 12 bandes protéiques dans la zone 2, qui sont caractérisées par les gammes de masse moléculaires approximatives de 50- 250 KDa et 10-50 KDa respectivement.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et des sujets sains révèle des variations quantitatives et qualitatives, dont la variation qualitative la plus importante observée était dans la zone de HPM (zone 1), le doublet de bandes dont le poids moléculaire est d'environ 70 KDa présentent des variations importantes, ce doublet est présent chez tout les patients et les témoins sauf les patients 14 et 19 (flèches rouges, Figure 7), à cause de sa présence chez les témoins et son absence chez deux patients, ce doublet ne peut pas être utilisé comme biomarqueur. Pour les variations quantitatives, l'exemple le plus important est celui de la bande protéique dont le poids moléculaire approximatif est de 25 KDa (flèche jaune, figure 7), cette bande est présente chez tous les échantillons (témoins et malades), en effet elle était faiblement concentrée chez les deux témoins, et présentait des concentrations très variables entre le reste des malades, les patients présentant les concentrations les plus élevées (14, 17, 18 et 20) étaient des patients avec des pathologies associées.

1.2. Les protéines salivaires dénaturées et non réduites

Les diagrammes électrophorétiques des 31 échantillons (29 malades et 2 témoins) analysés renferment de 8 à 21 bandes protéiques décelables qui se répartissent dans deux zones des protéines salivaires avec des mobilités allant de 7 à 143 mm (Figure 8).

Les diagrammes sont lus par zone. Nous dénombrons 22 bandes protéiques de mobilités différentes qui se répartissent comme suit : 11 bandes protéiques dans la zone 1 et 11 bandes protéiques dans la zone 2, qui sont caractérisées par les gammes de masse moléculaires approximatives de 50- 250 KDa et 10-50 KDa respectivement.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et des sujets sains révèle des variations dans la composition protéique qui résident surtout dans la zone de HPM (zone 1) dont le poids moléculaire est situé entre 50 et 60 KDa (environ 55 KDa) (indiquée par une flèche dans la figure 8), cette bande est considérée comme étant la bande la plus variable quantitativement, cette protéine était fortement concentrée chez le sujet sain (figure 8), avec une concentration modérée chez quelques patients (2, 3 et 5), une faible concentration chez d'autres patients (4, 7, 8, 9 et 10) et à l'état de traces chez quelques patients et (1 et 12), ce qui lui confère la propriété d'un biomarqueur.

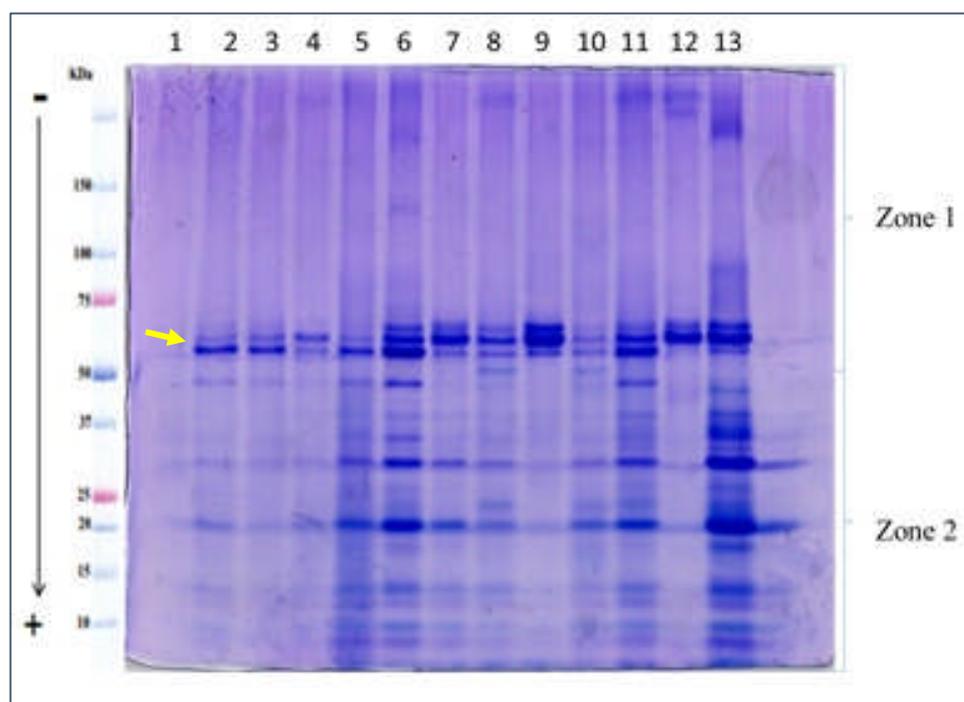


Figure 8 : Fractionnement des protéines salivaires dénaturées et non réduites par SDS-PAGE., 6 : Témoin 2, de 1 à 5, de 7 à 13 : des patients

Ces différences observées entre les malades peuvent être probablement dues à des facteurs tels : l'âge, le stade de la maladie, les pathologies associées et la physiologie des patients.

2. Etude de la variabilité des protéines salivaires

2.1. En condition dénaturante et réductrice

2.1.1. Étude des protéines salivaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 31 échantillons a permis de distinguer 12 types de protéines salivaires de haut poids moléculaire (Tableau 1).

Tableau 1: variabilité des protéines salivaires de HPM

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences (%)
1	37	E4, E10	6.45
2	48	T1, T2, E6, E7, E9, E10, E15, E16, E17, E21, E22, E23, E24, E26, E27, E29	51.61

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

3	52	T1, T2, E3, E4, E12, E13, E15, E16, E17, E18, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29	64.51
4	56	T1, T2, E4, E10, E 12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29	70.96
5	59	T1, T2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E23, E25, E27	48.38
6	60	T1, T2, E1, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E15, E16, E17, E20, E22, E23, E25, E26, E27	74.19
7	63	T1, T2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E13, E17, E18, E22, E23, E25, E26, E27	67.74
8	65	T2, E4, E12, E17, E18, E20, E21, E28	25.80
9	67	T2, E4, E7, E8, E10, E17, E22, E23, E25, E28, E29	35.48
10	70	T2, E5, E7, E10, E12, E13, E17, E18, E20, E22, E28, E29	38.70
11	73	T2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E10, E11, E17, E18, E23, E25, E26, E27	48.38
12	77	T1, T2, E3, E4, E5, E7, E8, E10, E11, E15, E16, E17, E22, E23, E24, E25, E28	54.83

La diversité des bandes protéiques est peu importante dans la zone 1 de haut poids moléculaire (Figure 7). Dans cette zone la bande protéique 6 dont la mobilité est de 60 mm est présente chez 23 échantillons ayant une fréquence de 74,19 %, donc c'est la « protéine salivaire dominante » dans cette zone, suivie de la bande protéique 4 de mobilité 56 mm retrouvée chez 22 échantillons avec une fréquence de 70,96%. La bande protéique 7 de mobilité 73 mm est moins fréquente avec 67,74 %. Des bandes protéiques moins fréquentes sont observées, tel que les bandes 3, 12, 2, 11, 10, 9 et 8 dont les fréquences

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

respectives sont 64.51 %, 54.83 %, 51.61 %, 48.38 %, 38.70 %, 35.48 % et 25.80 % (Tableau 1). Ainsi la bande protéique 1 de mobilité 37 mm présente la plus faible fréquence (6.45%).

2.1.2. Étude des protéines salivaires de FPM

L'analyse électrophorétique des protéines salivaires de faible poids moléculaire des 31 échantillons nous a permis de distinguer 12 protéines salivaires de mobilités différentes (Tableau 2). Ainsi nous notons un grand polymorphisme de ces protéines salivaires localisées dans la zone 2.

Tableau 2: variabilité des protéines salivaires de FPM

Bandes	Mobilité (mm)	Echantillons	Fréquence (%)
13	80	T1, E3, E4, E8, E10, E18, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29	45.16
14	85	T1, T2, E6, E10, E12, E13, E15, E17, E18, E19, E20, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29	61.29
15	90	T1, T2, E3, E4, E5, E7, E8, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E25, E29	67.74
16	95	T1, T2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E25, E28, E29	87.09
17	101	T1, T2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E10, E11, E25, E29	45.16
18	105	T1, T2, E3, E7, E8, E10, E14, E17, E18, E23	32.25
19	112	T1, T2, E4, E5, E7, E8, E10, E11, E12, E13, E14, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E28, E29	70.96
20	116	T1, T2, E3, E4, E5, E7, E8, E10, E12, E13, E14, E17, E18, E19, E20, E21	51.61

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

21	122	T1, T2, E3, E4, E5, E7, E8, E10, E11, E12,E13, E14 E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E28, E29	74.19
22	125	T1, T2, E7, E14, E22, E23, E24, E25, E28, E29	32.25
23	130	T2, E4, E8, E10, E11, E22, E23, E24, E25, E28, E29	35.48
24	133	E10, E22, E23, E24, E25, E28, E29	22.58

La plus haute fréquence protéique observée est celle de la bande 16, de mobilité 95 mm retrouvée chez 27 échantillons avec une fréquence de 87,09 %, suivie de la bande 21 retrouvée dont la mobilité est de 122 mm avec une fréquence de 74,19 % et la bande 19 retrouvée chez 22 échantillons avec une mobilité de 112 mm (74,19%), ensuite viennent les bandes protéiques 18 et 22 dont la fréquence est 32,25 % (10 échantillons), qui apparaissent avec des mobilités différentes de 105 et 125mm respectivement. Puis les bandes protéiques 13, 14, 15, 17, 20 et 23 apparaissent avec des mobilités 80, 85, 90, 101 et 116 mm respectivement et des faibles fréquences 45,16 %, 61,29 %, 67,74 % et 45,16 % respectivement. La plus faible fréquence observée dans cette condition est de 22,58% pour la bande 24 retrouvée chez 7 échantillons dont la mobilité est de 133mm (Tableau2).

2.2. En condition dénaturante et non réduite

2.2.1. Étude des protéines salivaires de HPM

Les différentes protéines salivaires de haut poids moléculaires observées dans la zone 1 sont au nombre de 10 avec des mobilités différentes (Tableau 3)

Tableau 3: Variabilité des protéines salivaires dénaturées non réduites de HPM

Bandes	Mobilité (mm)	Échantillons (E)	Fréquence (%)
1	8	T1 , E8,E9 ,E11,E14,E17,E19,E20,E21,E22,E23	35.48
2	11	E9, E17, E19, E20, E22, E28	19.35
3	48	T1,T2,E4,E10,E11,E16,E21,E22,E23,E25, E27	35.48

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

4	57	T1,T2,E4,E10,E11,E13,E15,E16,E17,E20, E21,E22,E23,E24,E25,E27,E28,E29	58.06
5	64	T1,T2,E10,E11,E12,E13,E15,E16,E17,E18 ,E20,E21,E22,E23,E24,E25,E26,E28	58
6	72	T1,T2,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E 13,E14,E15,E16,E17,E19,E18,E20	61.29
7	76	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10, E21,E22,E23,E24,E25,E26,E27,E28,E29	67.6
8	80	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E10,E11, E12,E13,E14,E15,E16,E17,E18,E19,E20,E26	70.96
9	84	T1,T2,E7,E12,E14,E17,E25,E26,E27,E28, E29	35.48
10	88	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E7,E8,E10,E12,E13,E 14,E15,E17,E19,E25,E26	54.83

Sur la base de la variabilité protéique observée au niveau de cette zone, les bandes protéiques les plus fréquentes sont les bandes : 7 et 8 de mobilités 79 mm et 80 mm respectivement avec des fréquences respectives de 67.6% et 70.96%, suivies de la bande 6 de mobilité 72 mm retrouvée chez 19 échantillons, présentant une fréquence de 61.29% puis les bandes 4 et 5 avec des mobilités respectives de 57 mm et 64 mm avec des fréquences de 58.06 et 58% respectivement. Enfin les bandes 1 et 3 de mobilité 79 mm et 48 mm sont retrouvées chez 11 échantillons avec une fréquence de 35.48%.

Une bande protéique de très faible fréquence est observée dans la zone de HPM qui est la bande : 2 avec une fréquence de 6.66% retrouvée chez un seul patient.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

2.2.2. Étude des protéines salivaires de FPM

L'analyse électrophorétique des protéines salivaires de faible poids moléculaire a permis de dénombrer 12 bandes protéiques de mobilités différentes (Tableau 4)

Tableau 4: Variabilité des protéines salivaires non réduites de FPM

Bandes	Mobilité (mm)	Échantillons (E)	Fréquences (%)
11	95	T1,T2,E3,E4,E5,E8,E10,E12,E13,E15,E17,E21, E22,E23,E24,E25,E26,E29	58.06
12	101	T1, T2, E3, E4, E5, E7, E8, E9, E10, E11 E12,E13,E14,E15,E16,E17,E18,E19,E20,E26,E2 9	64.51
13	105.1	T2, E4, E5, E8, E10, E14, E17, E26, E28	29.03
14	109.01	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E14,E 16,E17,E19,E20,E21,E22,E23,E24,E25,E26,E27,E28	80.64
15	114	T1,T2,E3,E4,E8,E10,E12,E13,E14,E15,E16,E17 ,E18,E19,E20,E22,E23,E29	58.06
16	119.7	T2,E4,,E7,E8,E10,E12,E14,E16,E17,E22,E24,E 28,E29	41.93
17	122.3	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E14,E 26	45.16
18	128.3	T1,T2,E3,E4,E5,E7,E8,E10,E11,E12,E13,E14,E 15,E16,E17,E18,E19,E20,E26	61.29
19	133.6	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E 12,E13,E14,E15,E16,E17,E18,E19,E20,E21,E22,E23, E24,E25,E26,E27,E28,E29	100
20	138.2	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E 12,E13,E14,E15,E16,E17,E18,E19,E20,E21,E22,E23, E24,E25,E26,E27,E28,E29	100
21	143.5	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E1,,E1 2,E13,E14,E15,E16,E17,E18,E19,E20,E21,E22,E23,E 2,,E25,E26,E27E28,E29	100

22	144.5	T1,T2,E1,E2,E3,E4,E5,E6,E7,E8,E9,E10,E11,E12,E13,E14,E15,E16,E17,E18,E19,E20,E21,E22,E23,E24,E25,E26,E27,E28,E29	100
-----------	-------	--	-----

D'après l'observation du tableau ci-dessus on peut constater que les bands protéiques 18, 19, 20, 21 et 22 de mobilités respectives de 133.6 mm, 138.2 mm, 143.5 mm ,144.5 mm et 146.23 mm sont les plus fréquentes avec une fréquence de 100%, suivies de la bande 14 de mobilité 109. 01mm, présente dans 24 échantillons avec une fréquence de 80 %, suivie par les bandes 12, 18 et 15 et 11 dont les mobilités sont 101, 128.3,114 et 95mm respectivement, présentes chez 21 échantillons avec des fréquences respectives de 64.51%, 61.29% , 58.06% et 58.06%. Ensuite les bandes 7 et 6 de mobilités 122.3, 119.7mm respectivement avec des fréquences de 45.16%,41.93%. La bande 3 de mobilité 105.1mm retrouvée chez 9 échantillons était la bande la plus (29.04%).

3. Classification hiérarchique des protéines salivaires

Les relations entre les différents patients sont établies à partir de leurs ressemblances dans la composition protéique, pour cela, nous avons fait appel à une représentation sous forme d'arbre hiérarchique ou dendrogramme qui constitue sans doute la représentation la plus parlante. Les regroupements effectués à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemble des éléments qui sont plus ou moins proches entre eux plus on avance dans le regroupement plus on se rapproche du sommet de l'arbre.

3.1. Classification des protéines salivaires dénaturés et réduites

Dans cette condition, et suivant la classification hiérarchique UPGMA, la population d'étude se répartit dans deux principaux groupes à une distance de 3.5.

Le premier groupe comprend la majorité des échantillons analysés (21 patients et 2 témoins), ce groupe présente un haut degré de similitude notamment dans l'intervalle de distance de 2 à 3. Au sein de ce groupe, 3 sous-groupes se révèlent, le sous-groupe 1 comprend le témoin 1 et 6 patients (22, 23, 25, 24, 28 et 29). Comme le premier sous-groupe le sous-groupe 2 comprend le témoin (témoin 2) et 8 patients, avec un degré de similarité moindre. Les 7 patients restants se répartissent dans le troisième sous-groupe.

Le deuxième groupe ne renferme que 8 patients répartis en deux sous-groupes.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Cliniquement, tous les patients (pour les deux sexes) et sans particularité ont subi un acte chirurgical et une chimiothérapie et dans quelques cas une radiothérapie. En outre, les patients recrutés appartiennent à la même tranche d'âge (44 et 72 ans), sans pathologies associées sauf pour la patiente 25 (diabétique).

Un cas particulier doit être signalé, celui des patients 12 et 20 qui présentent des profils entièrement similaires malgré la différence d'âge (32 et 72 ans respectivement). Le seul critère qui leur réunit est le sexe (masculin).

L'état physiologique et pathologique, l'âge et le sexe des patients ne sont pas corrélés avec les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires (Figure 1), c'est-à-dire la classification des patients en fonction des profils protéiques n'a pas suivi l'état des patients.

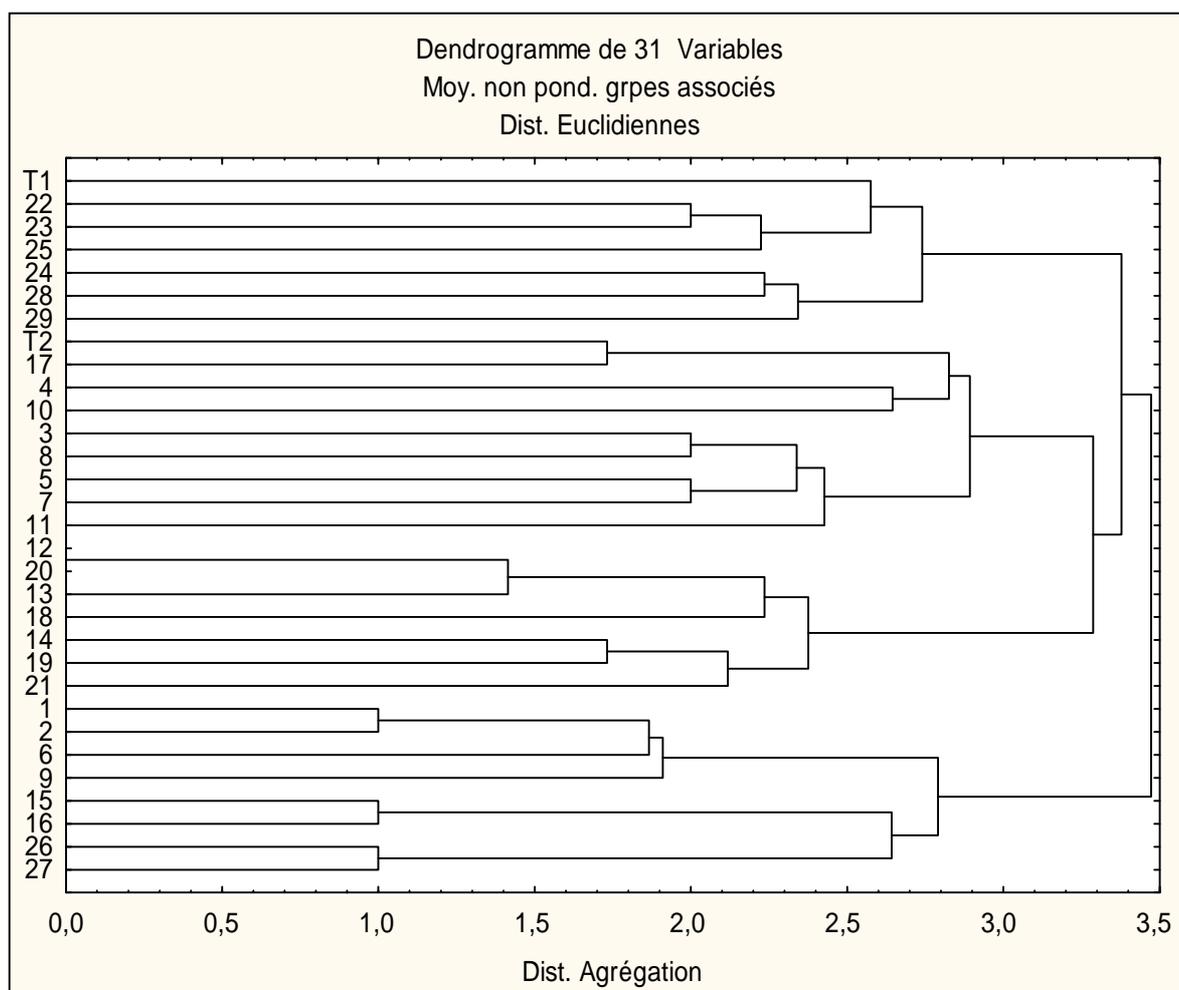


Figure 9 : Dendrogramme des 31 échantillons en condition dénaturante et réductrice

3.2. Classification des protéines dénaturée et non réduites

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégations révèle de nombreux groupes. Deux grands groupes se présentent dans le dendrogramme qui se divisent eux-mêmes en deux groupes, ces derniers se divisent en plusieurs groupes.

La classification hiérarchique basée sur la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean=Moyenne non pondérée des groupes associés) classe la population étudiée en divers groupes. La première division à la distance 3.25 révèle deux grands groupes. La deuxième division à la distance 2.95 divise la population en 4 groupes.

Le premier groupe G1 est constitué de deux sous-groupes : le premier sous-groupe regroupe les témoins et 7 patients (4, 10, 8, 3, 5, 7 et 28) avec des degrés de similarité très élevés entre eux et avec les témoins.

Le deuxième groupe G2 renferme 8 patients (11, 16, 12, 13, 15, 18, 19 et 20) avec des niveaux de similarités moyens sauf entre les patients 13 et 15 qui sont à 100% similaires.

Le troisième groupe G3 renferme seulement 4 patients (1, 2, 6 et 9) présentant moins de similitude par rapport aux deux premiers groupes.

Le quatrième groupe G4 regroupe les 8 patients restants (21, 23, 24, 29, 25, 27 et 28) qui présentent une similitude modeste.

Comme pour la première condition (dénaturante et réductrice), la classification des patients suivant les profils électrophorétiques dans la condition dénaturante non réductrice, n'a pas suivi l'état physiopathologique des patients ; à titre d'exemple : les deux patients : 4 et 21 appartiennent à deux groupes différents : 1 et 4 respectivement, les deux malades présentent un cancer colorectal, ayant subi un acte chirurgical avec une chimiothérapie.

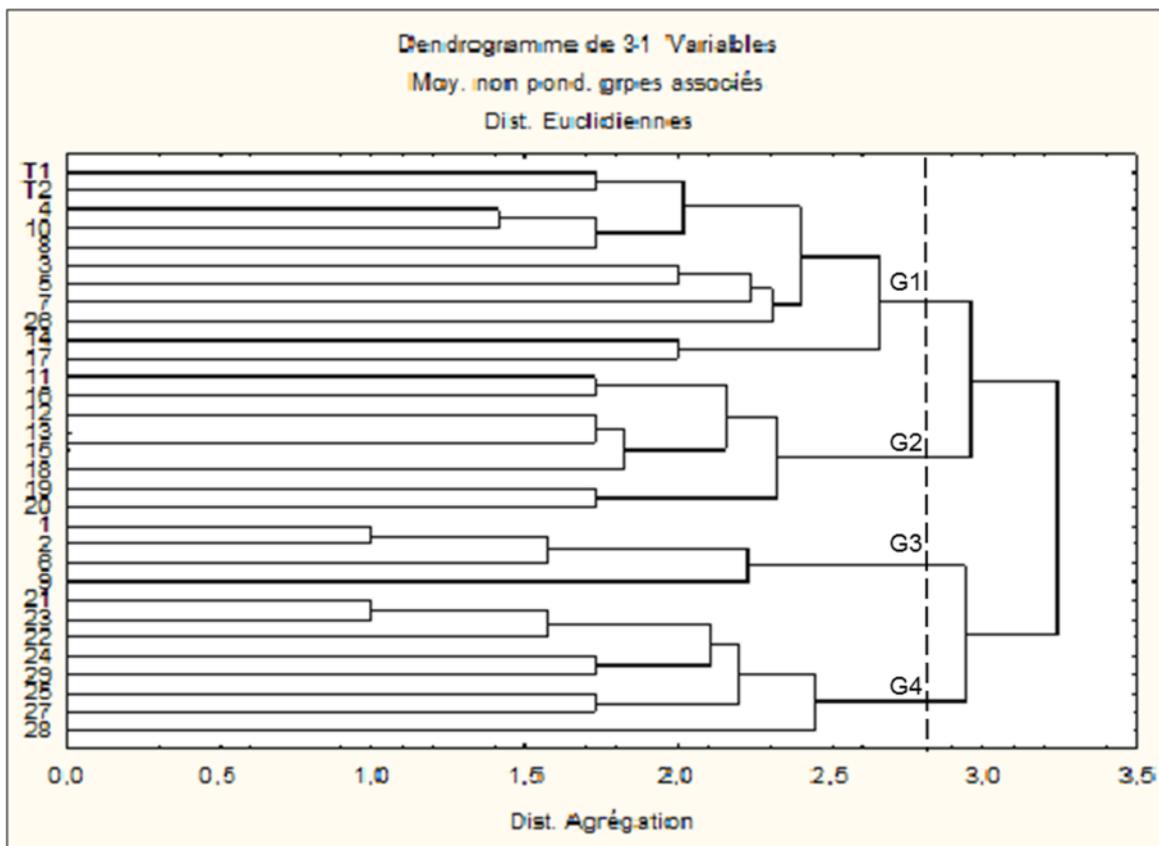


Figure 10: Dendrogramme des 31 échantillons en condition dénaturante et non réductrice

4. Indice de similarité des diagrammes protéiques

Pour quantifier l’analogie ou la dissemblance des diagrammes, on calcule un indice de similarité ou de dissimilarité inspiré de Dedio, et *al.*, (1969). L’indice de similarité (IRS) est calculé en rapportant l’IAS (indice de similarité absolue) au nombre total (N) des composants présents dans l’un au moins des diagrammes des échantillons comparés. L’IAS présente l’ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes entre les deux diagrammes. On considère qu’une bande n’est pas significativement différente d’une autre lorsqu’elles sont de même mobilité et/ou qu’elles ne se distinguent pas par au moins deux classes de concentration.

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

4.1. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites

Les indices de similarités ont été effectués pour les 31 échantillons (29 ayant un cancer colorectal et 2 témoins), ils sont représentés sous forme de matrice dans le tableau 5. Il en ressort que l’indice de similarité se situe entre 0 et 100%.

D'après le tableau 5 :

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances c'est le cas du patient 28 avec les patients 1 et 2 et le patient 9 avec le patient 18 et 29 (IRS=6%), ainsi le patient 8 avec la patient 9 (IRS=7%). Une valeur d'indice de similarité de 0 a également été observée chez quelques échantillons tels que les patients 14, 19 et 28 avec le patient 9 ainsi que le patient 24 avec les deux patients 1 et 2. Inversement, lorsque la valeur de l'IRS= 100%, cela signifie que les profils sont similaires (ces deux patients présentent des diagrammes identiques avec la même composition protéique), c'est le cas des patients 12 et 20 (tableau 5), cela renforce le résultat du dendrogramme (les deux patients se retrouvent compatibles). Des valeurs d'IRS moyennes ont été aussi observées, à titre d'exemple : (IRS=50) qui a été trouvé : entre le patient 9 et le patient 3 et le témoin T1, le patient 15 avec le patient 12, le patient 21 avec le patient 19, le patient 27 avec le patient 23, le patient 28 avec le patient 25. Ainsi, on distingue des valeurs d'IRS importantes, par exemple :

- IRS à 60 entre les patients : 3, T1 et 3, 9 et 15, 12.
- IRS à 75 entre les patients : 7 et 5.
- IRS à 88 entre les patients : 16 et 15.

4.2. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturés et non réduites

Les indices de similarités ont été effectués pour les 31 échantillons (29 ayant un cancer colorectal et 2 témoins), ils sont représentés sous forme de matrice dans le tableau 6. Il en ressort que l'indice de similarité se situe entre 0 et 100%, révélant ainsi la dissemblance en protéines salivaires entre les patients étudiés.

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances c'est le cas de patient 19 avec les patients 3 et 5 et le patient 29 avec le patient 7 et 8 (IRS=9%), ainsi que le patient 29 avec le patient 12 et le patient 26 avec 12 (IRS=8%). Une valeur d'indice de similarité de 0 a également été observée chez quelques échantillons tels que le patient 18 avec le patient 11 et le patient 11 avec les patients 4 et 5. Inversement, lorsque la valeur de l'IRS= 100%, cela signifie que les profils sont similaires (ces deux présentent des diagrammes identiques avec la même composition protéique), c'est le cas des patients 18 et 4, 8 et 7 ainsi que les patients 10 et 9, cela renforce le resultat du dendrogramme (les deux patients se retrouvent compatibles). Des valeurs d'indice de

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

similarité moyennes ont été aussi observées, à titre d'exemple : (IRS=50) qui a été trouvé : entre le patient 12 et le patient 9 et le patient 10, le patient 13 avec le patient 1, le patient 1 avec le témoin 1, le patient 14 avec le patient 2, le patient 25 avec le patient 16. Ainsi, on distingue des valeurs d'IRS importantes, par exemple :

1. IRS à 60 entre les patients : 23, T1 et 9, 4 et 5, 4.
2. IRS à 75 entre les patients : 23 et 13.
3. IRS à 78 entre les patients : 14 et 13.

Il existe une relation entre l'hétérogénéité électrophorétique des protéines salivaires et l'état physiologique est pathologique des patients atteints du cancer colorectal. Les patients dont les diagrammes sont très proches ont en effet généralement une composition protéique voisine et présentent naturellement à la fois des ressemblances protéiques d'où physiologique et/ou pathologique proche et des indices de similarités élevés. A l'inverse, celles dont les diagrammes sont très différents, ont le plus souvent des origines physiologiques et/ou pathologiques éloignées et des IRS faibles.

Résultats et Discussion

T1	T2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
100%	70%	28%	22%	60%	64%	20%	37%	62%	65%	22%	70%	47%	47%	53%	44%	44%	39%	59%	52%	39%	45%	42%	62%	67%	53%	71%	37%	42%	45%	57%	T1
	100%	25%	20%	57%	65%	60%	40%	80%	59%	20%	71%	38%	55%	55%	40%	38%	33%	85%	62%	35%	55%	45%	57%	65%	35%	65%	33%	38%	48%	52%	T2
		100%	80%	38%	28%	42%	63%	31%	33%	50%	24%	36%	14%	23%	8%	18%	20%	18%	12%	9%	15%	8%	18%	21%	0%	28%	18%	27%	6%	11%	1
			100%	31%	22%	33%	50%	25%	27%	50%	19%	27%	7%	15%	9%	9%	10%	11%	13%	11%	7%	8%	11%	16%	0%	22%	9%	18%	6%	12%	2
				100%	63%	67%	40%	61%	69%	60%	55%	53%	33%	41%	31%	31%	33%	50%	56%	25%	33%	29%	32%	48%	20%	55%	31%	38%	23%	27%	3
					100%	58%	30%	55%	74%	16%	70%	56%	35%	45%	30%	30%	32%	62%	52%	32%	45%	42%	48%	57%	32%	71%	30%	35%	45%	43%	4
						100%	43%	75%	69%	23%	57%	69%	44%	53%	33%	25%	27%	53%	44%	36%	44%	31%	33%	36%	15%	50%	18%	36%	24%	29%	5
							100%	41%	35%	50%	38%	31%	19%	27%	7%	33%	25%	32%	24%	15%	19%	13%	26%	37%	12%	37%	36%	55%	10%	21%	6
								100%	72%	25%	68%	53%	35%	42%	41%	26%	28%	65%	43%	28%	35%	32%	45%	55%	23%	55%	20%	25%	30%	41%	7
									100%	19%	71%	67%	30%	37%	25%	21%	22%	52%	45%	29%	30%	26%	41%	57%	24%	65%	21%	26%	32%	36%	8
										100%	19%	17%	7%	15%	0%	20%	22%	17%	6%	0%	7%	8%	18%	22%	7%	16%	33%	44%	0%	6%	9
											100%	48%	39%	45%	32%	32%	27%	65%	52%	33%	39%	30%	61%	70%	39%	70%	32%	36%	24%	57%	10
												100%	31%	40%	29%	29%	31%	42%	33%	31%	19%	27%	37%	40%	24%	56%	20%	19%	26%	32%	11
													100%	83%	46%	60%	38%	65%	67%	63%	100%	67%	42%	32%	29%	38%	27%	25%	47%	44%	12
														100%	46%	46%	38%	65%	67%	64%	83%	54%	50%	38%	29%	45%	36%	33%	39%	44%	13
															100%	23%	25%	39%	47%	67%	46%	55%	26%	30%	27%	30%	7%	6%	29%	35%	14
																100%	88%	47%	29%	36%	46%	42%	41%	37%	36%	37%	45%	42%	29%	35%	15
																	100%	41%	24%	27%	38%	45%	35%	32%	29%	32%	36%	33%	24%	24%	16
																		100%	72%	41%	65%	53%	57%	59%	33%	52%	39%	37%	48%	45%	17
																			100%	50%	67%	53%	43%	45%	32%	45%	38%	35%	47%	45%	18
																				100%	64%	60%	28%	25%	29%	32%	15%	14%	25%	38%	19
																					100%	67%	42%	32%	29%	38%	27%	25%	47%	44%	20
																						100%	32%	29%	33%	29%	21%	20%	35%	41%	21
																							100%	79%	69%	70%	41%	39%	13%	72%	22
																								100%	61%	80%	44%	60%	55%	57%	23
																									100%	53%	36%	33%	67%	63%	24
																										100%	37%	42%	60%	65%	25
																											100%	89%	22%	29%	26
																												100%	21%	26%	27
																													100%	71%	28
																														100%	29

Résultats et Discussion

T1	T2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
100%	60%	50%	56%	31%	25%	31%	67%	25%	25%	42%	42%	29%	23%	75%	58%	38%	44%	36%	25%	33%	30%	48%	61%	60%	44%	40%	31%	41%	13%	40%	T1
	100%	75%	63%	31%	25%	21%	79%	25%	25%	42%	42%	50%	33%	62%	58%	57%	44%	27%	25%	33%	44%	48%	47%	71%	53%	47%	26%	60%	20%	31%	T2
		100%	53%	40%	20%	17%	75%	33%	33%	40%	40%	56%	30%	50%	45%	58%	33%	23%	20%	21%	35%	40%	44%	62%	44%	39%	19%	50%	25%	20%	1
			100%	36%	21%	27%	69%	21%	21%	36%	36%	33%	20%	53%	50%	50%	39%	40%	21%	26%	56%	65%	48%	63%	56%	58%	38%	44%	25%	53%	2
				100%	33%	43%	29%	33%	33%	43%	43%	10%	29%	40%	33%	36%	23%	22%	33%	9%	36%	26%	29%	31%	27%	31%	17%	31%	10%	27%	3
					100%	60%	23%	20%	20%	60%	60%	0%	20%	33%	43%	18%	8%	25%	100%	10%	21%	16%	18%	25%	13%	12%	14%	15%	13%	33%	4
						100%	29%	14%	14%	43%	43%	0%	14%	27%	33%	15%	7%	50%	60%	9%	27%	20%	29%	21%	12%	17%	17%	13%	10%	40%	5
							100%	23%	23%	38%	38%	46%	23%	57%	54%	57%	41%	22%	23%	27%	42%	52%	58%	79%	50%	45%	30%	47%	27%	38%	6
								100%	100%	60%	60%	29%	75%	33%	43%	30%	27%	25%	20%	10%	21%	16%	18%	25%	21%	19%	9%	25%	13%	9%	7
									100%	60%	60%	29%	75%	33%	43%	30%	27%	25%	20%	10%	21%	16%	18%	25%	21%	19%	9%	25%	13%	9%	8
										100%	100%	22%	50%	56%	71%	36%	23%	50%	60%	19%	36%	26%	29%	42%	27%	24%	17%	31%	22%	27%	9
											100%	22%	50%	56%	71%	36%	23%	50%	60%	19%	36%	26%	29%	42%	27%	24%	17%	31%	22%	27%	10
												100%	25%	25%	30%	33%	21%	18%	0%	18%	18%	25%	28%	38%	25%	22%	12%	29%	20%	7%	11
													100%	30%	38%	40%	36%	22%	17%	14%	29%	15%	17%	23%	29%	25%	8%	33%	11%	8%	12
														100%	78%	46%	54%	33%	33%	32%	35%	47%	53%	75%	53%	47%	24%	50%	15%	38%	13
															100%	42%	38%	40%	43%	29%	31%	37%	41%	58%	40%	35%	26%	46%	18%	45%	14
																100%	50%	21%	18%	20%	60%	45%	29%	57%	71%	44%	19%	57%	33%	27%	15
																	100%	13%	8%	29%	39%	36%	33%	53%	56%	50%	22%	44%	13%	25%	16
																		100%	25%	17%	31%	24%	33%	27%	18%	28%	16%	19%	18%	33%	17
																			100%	10%	21%	16%	18%	25%	13%	12%	14%	15%	13%	33%	18
																				100%	21%	34%	37%	28%	31%	29%	44%	28%	13%	16%	19
																					100%	50%	29%	44%	65%	43%	29%	37%	25%	28%	20
																						100%	71%	55%	57%	52%	46%	35%	19%	33%	21
																							100%	52%	35%	50%	39%	32%	10%	30%	22
																								100%	63%	56%	26%	50%	29%	40%	23
																									100%	58%	29%	53%	25%	28%	24
																										100%	31%	47%	61%	39%	25
																											100%	26%	17%	35%	26
																												100%	29%	24%	27
																													100%	15%	28
																														100%	29

Conclusion

Ce travail a été entrepris afin d'explorer le protéome salivaire des patients atteints du cancer du côlon et le comparer avec celui des sujets sains par application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelles 'SDS-PAGE', pour la recherche de protéines spécifiques pouvant avoir la propriété de biomarqueur pour le diagnostic spécifique de la maladie.

La méthode de solubilisation des protéines est celle de Laemeli (1970) modifiée par Singh (1991), le choix de cette méthode était dans le souci d'avoir une meilleure expression des protéines et des profils électrophorétiques reproductibles. Par la suite, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH alcalin (SDS-PAGE 8.8) dans les conditions réductrices et non réductrices a été faite pour fractionner les protéines.

L'application de cette technique nous a permis d'obtenir des profils protéiques salivaires nettement séparés et reproductibles où 24 et 22 bandes protéiques de mobilité et d'intensité différente, réparties dans les deux zones de FPM et HPM, ont été détectées dans les conditions réductrice et non réductrice respectivement, ainsi cette technique nous a permis de :

- Comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec ceux des témoins et de remarquer que chacun des échantillons possède un profil protéique qui lui est propre et qui peut rassembler ou pas à celui d'un autre échantillon ou celui du témoin par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines.
- Révéler les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques de haut et de faible poids moléculaire.
- Distinguer les différences dans la composition protéiques des patients malades et des témoins.
- Identifier quelques protéines susceptibles d'être des biomarqueurs salivaires de la maladie dont la plus marquante est une bande protéique détectée dans la zone de HPM (avec un poids moléculaire apparent d'environ 55 KDa) dans la condition native.

En outre, l'analyse statistique effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité et la classification hiérarchique des patients en se basant sur leurs diagrammes types obtenus n'était pas corrélée avec l'état physiopathologique des patients.

Conclusion

En perspectives, une amélioration de l'étude sur les protéines salivaires est envisagée par l'utilisation des techniques avec une meilleure résolution telle que l'électrophorèse bidimensionnelle, ensuite la leur identification par spectrométrie de masse.

Références Bibliographique

1. Acuna G.S., Franco-Garrocho L.E., Alonso S.T et Uribe L.K. 2011. Parotid gland giant pleomorphic adenoma: Report of case and literature revision ». *Revista oralia*, 12 (36): 679-682
2. Biyi A., Benrais N., Albouzidi A et Benomar S. 1998. Mécanisme de la carcinogenèse à la lumière des données de la biologie moléculaire. *Médecine du Maghreb*, 69
3. Bouchet A et Cuillert J. 1995. Anatomie descriptive topographique et fonctionnelle. 3^{ème} édition. Ed. Masson, Paris, pp 1453
4. Bounedjar A et Smail F. 2012. Service d'oncologie médicale, Centre anti cancer, Blida, GROS Plan Sur Le Cancer Colorectal. *Santé-Magazine*, 3: 28-30
5. Catala M., André J.M et Poirier J. 2008. Histologie : organes, systèmes et appareils. Ed. Université Pierre et Marie Curie.Paris, pp 102
6. Chirurgie dentaire. 2013. Nancy : Université Henri Poincar-Nancy1. (En ligne). Disponible sur : <http://docnum.univ-lorraine.fr/public/BUPHA_TD_2012_GEORGES_DANY.pdf>. (Consulté le 9 mai 2015)
7. Cours médecine. 2013. La sécrétion salivaire. (En ligne). Disponible sur : <<http://www.cours-medecine.info/physiologie/secretion-salivaire.html> >. (Consulté le 15 juin 2015)
8. DJB S.J., McDermott F.T., Hopper J.L., Debney E.A et Johnson W.R. 1993. Hughes ESR. Cancer in relatives of patients with common colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine*, 118: 785-790
9. Drake L.A., Vogl W et Mitchell A.W. 2006. Anatomie pour les étudiants. Ed. Elsevier. Paris, pp 556
10. Elaine N.M. 2014. Anatomie et Physiologie Humaines. 5^{ème} édition. Ed. Pearson Education. pp 1300
11. Fabre E., Spano J.P., Atlan D., Braud A.C., Mitry E., Panis Y et Faivre J. 2000. Cancer of the colon: an update. *Bulletin du cancer supplément*, 4:5-20
12. Faiver J., Boutron M.C., Senesse P., Senesse P., Couillault C., Belghiti C et Meny B. 1997. Environmental and familial risk factors in relation to the colorectal adenoma carcinoma sequence: results of a case-control study in Burgundy (France). *European Journal of Cancer Prevention*, 6:127-31
13. Ganong William. 2005. *Physiologie médicale*. Les glandes salivaires et la salive. Eds. De Boeck, pp 849

Références Bibliographique

14. Georges D. 2012. Pathologie générale et salive. Thèse de diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire. Nancy : Université Henri Poincar-Nancy1, pp 256
15. Gramont A., Housset M., Nordlinger B et Rougier P. 2012. *Le cancer colorectal en questions*. 2^{ème} édition. Fondation ARCAD, Aide et recherche en cancérologie digestive, pp 146
16. Guenard H. 2001. *Physiologie humaine*. Contrôle de la sécrétion salivaire. Wolters Kluwer, pp 616.
17. Jass J.R et Sialic S.M. 1992. Acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer- a morphological, mucin and lectin histochemical study. *Pathology*, 24: 233-242
18. Jerom C. 2007. *Etude expérimentale du test salivaire cario analyse sur des patients subissant une radiothérapie de la sphère ORO faciale*. Thèse de docteur en chirurgie dentaire. Metz : Université Henri Poincar-Nancy1, pp 117
19. Kierszenbaum A.L. 2006. *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. Aspects histologiques des différents types de glandes salivaires principales. De Boeck, pp 451-453
20. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680- 685.
21. Lebeau V.J. 2013. Physiologie salivaire. (En ligne). Disponible sur : http://www.uvp5.univparis5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble_1011/lebeau_jacques/lebeau_jacques_P02/lebeau_jacques_P02.pdf . (Consulté le 14 mai 2015)
22. Lodish H., Berk A et Matsudaira P. 2005. *Biologie moléculaire de la cellule*. 3^{ème} édition. Eds. DeBoeck, Paris, pp 9
23. Lothe R.A., Peltomäki P., Melfing G.I., Aaltonen L.A., Nyström-Lahti M., Pylkkänen L et al., 1993. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Research*, 53: 5849-5852
24. Merlin J.L. 2013. Les biomarqueurs moléculaires en oncologie. (En ligne). Disponible sur : https://books.google.fr/books?id=vRdRBAAAQBAJ&pg=PA20&dq=biomarqueurs+types&hl=fr&sa=X&ei=wzFVVdCwLKar7Ab_loDoBw&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=biomarqueurs%20types&f=false >. (Consulté le 13 Mai 2015)
25. Oukkal M. 2002. Les cancers digestifs en Algérie. *Le quotidien*, 03 Avril 2007.
26. Parkin D.M., Muir C.S, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell. 1992. Cancer Incidence in Five Continents, vol 6.Eds. IARC Scientific publications, Lyon, pp 120.
27. Ponz de Leon M., Sassatelli R., Benatti P et Roncucci L. 1993. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. *Cancer*, 71: 3493-3501

Références Bibliographique

28. QA International Collectif. 2009. *Le Visuel du corps humain*. Morphologie homme femme. Québec, pp 151
29. Rougier P. 2004. Cancers du côlon et du rectum : mieux les dépister et mieux les traiter. *La Revue du praticien*, 54 : 133-142
30. Science et avenir. 2008. La salive pour remplacer les prises de sang. (En ligne). Disponible sur : <<http://www.sciencesetavenir.fr/sante/20080326.OBS6728/la-salive-pour-remplacer-les-prises-de-sang.html>>. (Consulté le 11 juin 2015).
31. Singh N.K., Shepherd K.W et Cornish G.B. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 14: 203-208.
32. Viguié J, Bourlier P, Karsenti D, Calan I, Danquechin DE. 2003. Cancer du côlon. *Encyclopédie de Médecine et de Chirurgie Gastro-entérologie*, 9 :10-18.
33. Weitz J., Khoch M., Debus J., Hohler T., Galle T., P.R et Buchler M.W. 2005. Colorectal cancer. *Lancet*, 365 :153-165
34. Winawer S.J., Zauber AG., Gerdes H., O'Brien M.J., Gottlieb L.S et Sternberg S.S. 1996. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. *New England Journal Of Medicine*, 11: 82-87

Solutions utilisées pour la SDS-PAGE

Solution mère d'acrylamide à 40% (à préparer avec gants et masque)

- Acrylamide 40 g
- Eau distillée 100 ml

Solution mère de bisacrylamide à 2% (à préparer avec gants et masque)

- Bisacrylamide 2 g
- Eau distillée 100 ml

Solution d'ammonium persulfate à 1% (à préparer temporairement)

- APS 0,1 g
- Eau distillée 10 ml

Solution stock de SDS à 10%

- Sodium Dodécyl Sulfate 10 g
- Eau distillée 100 ml

Tampon Tris HCl pH 6,8 (à préparer sous la hotte avec gants et masque)

- Tris 30,285 g
- Eau distillée qsp 200 ml
- Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant 19,5 ml
- Eau distillée qsp 250 ml
- qsp 250 ml

Tampon Tris HCl pH 8,8 (à préparer sous la hotte avec gants et masque)

- Tris 60,57 g
- Eau distillée qsp 400 ml
- Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant 8 à 10 ml
- Eau distillée qsp 500 ml

Tampon de migration

- Glycine 70,55 g
- Tris 15 g
- SDS 2 g

Annexe 1

- Eau distillée qsp 5000 ml

Solution de coloration (pour deux gels)

- TCA 60% 100 ml
- Solution mère de bleu de Coomassie R250 25 g
- Eau distillée qsp 5000 ml

Solution mère de bleu de Coomassie R250

- Bleu de Coomassie R250 10 g
- Ethanol 95° qsp 1000 ml

Gel de séparation (running gel)

- Acrylamide 40% 12,4 ml
- Bisacrylamide 2% 2,4 ml
- Eau distillée 8,6ml
- Tampon Tris HCl pH 8,8 15,2 ml
- SDS 10% 0,40 ml
- APS 1% 1 ml
- TEMED 20 µl

Gel de concentration (stacking gel)

- Acrylamide 40% 1 ml
- Bisacrylamide 2% 0,3 ml
- Eau distillée 10,2ml
- Tampon Tris HCl pH 6,8 1,7 ml
- SDS 10% 0,14 ml
- APS 1% 0,70 ml
- TEMED 0,014 µl

Annexe 2

Tableau 7 : Matrice binaire des protéines dénaturées et réduites révélées par SDS-PAGE

	M	T1	T2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
B1	37	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B2	48	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
B3	52	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
B4	56	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
B5	59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
B6	60	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	
B7	63	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	
B8	65	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
B9	67	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	
B10	70	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
B11	73	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	
B12	77	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	
B13	80	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
B14	85	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
B15	90	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	
B16	95	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	
B17	101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
B18	105	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
B19	112	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
B20	116	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
B21	122	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
B22	125	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
B23	130	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
B24	133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1

Colorectal cancer is cancer in the sitting area of the colon and rectum, prostate cancer results from the accumulation of mutations in different genes within the cells constituting the innermost layer of the colon wall called "mucosa".

The objective of this study is to investigate and explore the salivary proteome for patients with colorectal cancer by use of dimensional electrophoresis technique for research salivary biomarkers. For that whole saliva of a population composed of 29 patients was collected from the patients with colorectal cancer. Enrolled patients are between 32 et 72 years, this population was compared with 2 healthy subjects. Salivary proteins are solubilized and separated by one-dimensional electrophoresis SDS-PAGE under both conditions; reducing and non-reducing.

This method of analysis was used to obtain protein profiles clearly separated and reproducible salivary proteome where 24 and 22 protein bands of mobility and different intensity were detected in reducing and non-reducing conditions laid.

The hierarchical classification of patients based on their types obtained diagrams did not correlate with the pathophysiological state of patients. Several variations were observed, the most important is that of a protein band detected in the HPM area (with an apparent molecular weight of about 55 kDa) in native conditions showed significant quantitative and qualitative variations between patients and healthy controls, may have the property of a prognostic biomarker of disease. The exploration of the variation in salivary proteins can be used as an early diagnostic tool for cancer.

Keywords: Saliva, colorectal cancer, biomarker, electrophoresis, similarity

سرطان القولون والمستقيم هو سرطان ينمو في منطقة القولون والمستقيم، هذا السرطان ينتج عن تراكم طفرات في جينات مختلفة داخل الخلايا التي تشكل الطبقة الأعمق في جدار القولون والتي تسمى " بالغشاء المخاطي "

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة واستكشاف بروتينوم اللعاب للمرضى الذين يعانون من سرطان القولون والمستقيم عن طريق استخدام تقنية الأبعاد الكهربائية للبحث عن المؤشرات الحيوية للعبية المرضى ، لذلك قمنا بجمع لعاب 29 مريضاً يعانون من سرطان القولون والمستقيم، المرضى المسجلين في هذه الفئة لا يتجاوز سنهم 32 إلى 72 سنة حيث تم مقارنتهم مع 2 من الأصحاء ، البروتينات اللعابية ثم فصلها باستخدام تقنية الهجرة ذات بعد كهربائي واحد

وقد استخدمنا هذا الأسلوب من التحليل SDS-PAGE في شروط مختلفة الحد و غير الحد للحصول على لمحات من البروتينات اللعابية هذه الاخير التي تم فصلها بوضوح و تم الكشف عنها أظهرت 24 و 22 من الشرائط البروتينية ذات تنقل وكثافة مختلفة في شروط مختلفة من الحد و غير الحد احتراماً

إن التصنيف الهرمي للمرضى بناء علي حصولنا على المخططات لم يكن مطابقاً مع الحالة المرضية للمرضى حيث لوحظت اختلافات عدة والأكثر أهمية ذلك الشريط البروتين المكتشف في منطقة ذات الوزن الجزيئي حوالي 55 كيلو دالتون (في الظروف الأصلية) حيث ظهرت تغيرات كمية ونوعية كبيرة بين المرضى و الأصحاء، قد يكون ذلك مؤشر عن الإصابة بسرطان القولون و التباين الذي ظهر في البروتينات اللعابية يمكن استخدامه كأداة للتشخيص المبكر للسرطان

الكلمات المفتاحية : اللعاب، وسرطان القولون والمستقيم، العلامات البيولوجية، تقنية الهجرة الكهربائية والتشابه

