

République Algérienne Démocratique et Populaire
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
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre.....

N° de série.....

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie
Option Biochimie de la Nutrition

***Etude rétrospective et exploration du protéome
salivaire des enfants atteints d'allergie aux protéines
du lait de vache par application de la technique
d'électrophorèse SDS-PAGE.***

Présenté par :

- HAMAMA Nour El Imene
- CHENNI Rania

Devant le jury :

- Président : Prof. KHELIFI Douadi, ENSB
- Examineur : Dr. BECHEKRI Sakina, ATRBSA
- Encadreur : Dr. BELLIL Inès, UFMC1

Année universitaire 2018/2019

Remerciements

Nous remercions Allah le tout puissant, qui nous a donné la volonté et la patience pour étudier et élaborer ce modeste travail.

*Nous commençons par remercier Mme **Bellil Inès** d'être notre promotrice.*

Nous la remercions profondément pour son encouragement continue et aussi d'être toujours là pour nous écouter, nous aider et nous guider à retrouver le bon chemin par sa sagesse et ses précieux conseils.

Ainsi que son soutien moral et sa preuve de compréhension, ce qui nous a donné la force et le courage d'accomplir ce projet.

Nous tenons à remercier également les respectables membres de jury :

*Monsieur le Professeur **Khelifi Douadi**, président de jury*

et

*Dr **Bechkri Sakina** maître de conférences B, examinatrice de notre travail.*

*Nous remercions également monsieur **Gana Mohamed** pour son aide et ses précieux conseils.*

et

*Docteur **Boubidi** et docteur **Amirech** pour leur collaboration.*

Enfin, nous remercions les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie cet humble travail :

A mes chers et respectueux parents DJAMEL et NADIRA pour leur soutien indéfectible, pour l'amour dont ils m'ont toujours entouré et pour l'éducation qu'ils m'ont offerte.

Puisse dieu tout puissant vous garder et vous procurer santé et bonheur.

A mes très chères sœurs NOUREL HOUDA, MARWA.

A ma chère grand-mère maternelle ZAHIA, pour son affection à mon égard, et que dieu la bénisse.

A tous les membres de la famille HAMAMA et BENARIBA sans aucune exception.

A mes très chères amies avec lesquelles j'ai passé des bons moments.

A ma chère binôme RANIA pour son amour, sa patience, sa tolérance et pour les bons moments qu'on a partagé pour finir ce travail

A ma promotrice Mme BELLIL INES pour son suivi et son précieux conseil

A tous qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail

HAMAMA NOUREL IMENE

Dédicaces

Je dédie cet humble travail :

A la mémoire de mon cher père *Ahmed*

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 l'accueillir dans son infinie Miséricorde.

A ma chère mère *Nadia*

À qui je dois la réussite, pour l'éducation qu'elle m'a prodigué; avec tous les moyens et au prix de toutes les sacrifices qu'elle a consentis à mon égard. Je te serai reconnaissant toute ma vie, qu'Allah t'accorde longue vie dans la santé.

A la mémoire de ma grand-mère *Zoubeida*

Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur. Que Dieu, le miséricordieux, t'accueille dans son éternel paradis.

A mes chers oncles et tantes, cousins et cousines.

A tous les membres de la famille *CHENNI* et *MEROUANI*.

A ma chère binôme *Nour EL IMENE*

Merci pour ta patience, ta tolérance, pour les bons moments qu'on a partagés, je te dédie le fruit de nos efforts et te souhaite un avenir à la hauteur de tes ambitions. Que notre amitié dure.

A mes très chères amies avec lesquelles j'ai passé des bons moments.

A ma promotrice : Mme *BELLIL INES* pour son soutien et sa gentillesse.

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et affection.

CHENNI RANIA

Liste des abréviations

APLV :	Allergie aux Protéines du Lait de Vache
IAS :	Indice de Similarité Absolu
IgE :	Immunoglobuline E
IgG :	Immunoglobuline A
IgA :	Immunoglobuline G
IgM :	Immunoglobuline M
IRS :	Indice de Ressemblance
LV :	Lait de Vache
LPO :	Lactoperoxydase
MPO :	Myéloperoxydase
PRP :	Protéines Riches en Proline
SDS :	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE:	Sodium Dodécyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
TCA:	Trichloroasetic Acide
TEMED:	Tétra Méthyl-Ethylène-Diamine

Liste des figures

Chapitre 1 : Revue Bibliographique

Figure 01 : Classification des hypersensibilités selon Gell et Coombs.....	04
Figure 02 : Classification des allergies alimentaires adaptée.....	06
Figure 03 : Cascade immunologique Th1 et Th2 après exposition allergénique.....	07
Figure 04 : Constituants de la salive ou fluide oral.....	18

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Figure 05 : Répartition de la population selon le sexe.....	21
Figure 06 : Répartition de la population selon les tranches d'âges.....	22
Figure 07 : Répartition selon les maladies associées.....	22
Figure 08 : Fractionnement des protéines salivaires dénaturées et réduites par SDS-PAGE 1 à 14 : des patients, T : témoin.....	24
Figure 09 : Dendrogramme des 14 échantillons en condition dénaturante et réductrice.....	29

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Revue Bibliographique

Tableau 01 : Répartition des allergènes alimentaires chez l'enfant.....	05
Tableau 02 : Les allergènes du lait de vache, <i>Bos domesticus</i>	05
Tableau 03 : Concentrations en électrolytes (en <i>mmol/l</i>) au niveau du plasma et de la salive mixte en condition de stimulation ou non.....	09
Tableau 04 : Liste non exhaustive des protéines salivaires dans la salive entière et leur concentrations dans les glandes salivaires majeures (parotide, sous-maxillaire-sublinguale ou SMSL.....	14
Tableau 05 : Classification des biomarqueurs selon le NIH.....	15

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 06 : Répartition des enfants selon les antécédents.....	23
Tableau 07 : Distribution de la maladie selon l'âge de début de la maladie.....	23
Tableau 08 : Diagramme type des protéines.....	26
Tableau 09 : Variabilités des protéines salivaires en condition dénaturantes et réductrices.....	27
Tableau 10 : Indices de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	30

Sommaire

Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures
Résumés

Introduction..... 1

Chapitre I: Synthèse Bibliographique

I. L'allergie aux protéines du lait de vache.....	3
I.1. L'allergie.....	3
I.1.1. Définition.....	3
I.2.2. Types d'hypersensibilités.....	3
I.2.2.1. Hypersensibilité de type I.....	3
I.2.2.2. Hypersensibilité de type II.....	3
I.2.2.3. Hypersensibilité de type III.....	3
I.2.2.4. Hypersensibilité de type IV.....	4
I.2. Allergie alimentaire.....	4
I.2.1. Définition.....	4
I.2.2. Les allergènes alimentaires.....	4
I.3. Allergie aux protéines du lait de vache.....	5
I.3.1. Définition.....	5
I.3.2. Physiopathologie.....	6
I.3.3. Les symptômes.....	7
II. La salive.....	8
II.1. Définition.....	8
II.2. Composition biochimique de la salive.....	8
II.2.1. Constituants inorganiques.....	8
II.2.1.1. Compartiment gazeux.....	8
II.2.1.2. Eléments minéraux.....	9
II.2.2. Constituants organiques.....	10
II.2.2.1. Protéines extrinsèques.....	10
II.2.2.2. Protéines intrinsèques.....	10
III. Biomarqueurs.....	14
III.1. Définition et classifications.....	14
III.1.1. Définition.....	14
III.1.2. Classifications possibles.....	15
III.2. Nature des biomarqueurs.....	16
III.3. Application des biomarqueurs.....	16
III.4. Les Biomarqueurs salivaires.....	18
III.4.1. La salive, source de biomarqueurs.....	18

Chapitre II : Matériel Et Méthodes

II.1. Matériel biologique.....	19
II.1.1. Recrutement des patients.....	19
II.1.2. Recueil de la salive.....	19

II.2. Méthodologie de travail.....	19
II.2.1. Extraction des protéines salivaires.....	19
II.2.2. Électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide.....	20
II.2.3. Lecture des électrophorègrammes.....	20
II.2.4. Analyse statistique.....	20

Chapitre III : Résultats Et Discussion

III .1. Etude épidémiologique.....	21
III .1.1. Distribution de l'échantillon selon le sexe.....	21
III .1.2. Distribution de l'échantillon selon l'âge.....	21
III .1.3. Distribution de l'échantillon selon les maladies associées.....	22
III .1.4. Distribution selon les antécédents familiaux.....	23
III .1.5. Distribution de l'échantillon selon l'âge au diagnostic.....	23
III.2. Fractionnement des protéines salivaires et recherche de biomarqueurs.....	24
III.2.1. Analyse des profils électrophorétiques.....	24
III.2.2. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices.....	24
III.3. Etude de la variabilité des protéines salivaires.....	27
III.4. Classification hiérarchique des protéines salivaires et représentation en dendrogramme..	27
III.5. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	28
Conclusion	32
Références bibliographiques	33
Annexes	

Introduction

Introduction

Le succès d'un traitement, et même la différence entre la survie et la mort, est souvent liée à la détection précoce des maladies [24]. Le diagnostic précoce de la maladie, diminue sa progression et ses difficultés plausibles et ouvre la voie à une approche thérapeutique efficace [19]. Dans toutes les situations, la présence de molécules de signalisation des maladies et les changements de leurs niveaux dans les fluides biologiques jouent un rôle énorme. Ces espèces sont appelées marqueurs ou biomarqueurs et leur détection varie en fonction du fluide biologique (sang, salive, urine, larmes, tissus, etc.) [24].

La diversité des aliments et des méthodes de préparation fait partie de l'identité culturelle de chaque population [45]. Au cours des dernières années, les allergies alimentaires et autres maladies apparentées ont augmenté rapidement dans le monde entier, avec 1% - 2% d'adultes et 4% - 8% d'enfants ayant une haute réactivité médiée (IgE) par l'immunoglobuline E [27]. L'allergie alimentaire est la conséquence de réponses immunitaires inadaptées à des antigènes alimentaires courants et par ailleurs inoffensifs [45], elle est connue pour être la cause de certaines complications graves qui touchent la qualité de vie des gens, soulevant de nombreuses inquiétudes [27].

Le National Allergens and Institute of Medical Science (NAIMS) a défini les allergènes alimentaires comme des aliments ou des ingrédients qui peuvent être identifiés par des cellules immunitaires spécifiques et provoquer des réponses histéniques qui produisent des symptômes spécifiques, les allergènes alimentaires étant généralement des composés protéiques qui se lient aux protéines (appelés semi-antigènes) [27]. Huit aliments sont responsables de 90 % des réactions allergiques alimentaires : lait, œuf, arachide, fruits de mer, poisson, noix, soya et blé. Cependant, l'APLV est la plus fréquente [12].

L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) est définie par la survenue de manifestations cliniques dues à une réponse immunologique anormale après ingestion de ces protéines. La prévalence de l'APLV est de l'ordre de 2 à 3 % selon le mode de recrutement, l'âge des populations et les critères diagnostiques [51]. Ses symptômes souvent banals expliquent un diagnostic souvent tardif. Son tableau clinique toutefois est de plus en plus précis, différent selon que le mécanisme physiopathologique fait intervenir les IgE spécifiques des protéines du lait de vache ou non (formes IgE-médiées ou formes non IgE-médiées) [48].

Les marqueurs biologiques (biomarqueurs) représentent des signes médicaux (pouls, tension artérielle, composés chimiques) indiquant l'état de santé des patients, si leur mesure précise et reproductible peut être effectuée. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a donné

plusieurs définitions pour un biomarqueur : toute substance mesurable, son métabolite, sa structure, son processus ou même une mesure reflétant l'interaction entre un système biologique et un danger potentiel dans le corps humain qui peut influencer ou prévoir l'incidence des maladies. La réponse mesurée peut être biochimique, fonctionnelle, physiologique ou moléculaire. Ces caractéristiques incluent dans la même catégorie les molécules ou les processus qui peuvent être mesurés dans les fluides biologiques et influencer ou prédire l'incidence des maladies et la surveillance de la progression [24].

La salive est le fluide le plus disponible dans notre corps qui accomplit une variété de fonctions [43], résultant de la sécrétion exocrine, et représentant une matrice complexe qui reflète l'état hormonal, psychologique, immunologique, métabolique et nutritionnel d'une personne [24]. Des prélèvements simples et non invasifs, un stockage et un transport faciles et une grande cohérence avec les analyses sanguines grâce à la réflexion précise des conditions de la maladie font des biomarqueurs salivaires des outils de diagnostic valables [19].

En raison des avantages liés à sa facilité du prélèvement, de la manipulation et de la conservation par rapport au sang, la salive est de plus en plus utilisée pour la détection et la surveillance des biomarqueurs qui reflètent précisément l'évaluation de la santé. Il y a donc une forte demande pour le développement de nouvelles stratégies, procédures et méthodologies pour la détermination rapide et simple de différents biomarqueurs salivaires, même lorsqu'ils se trouvent dans des valeurs seuils [24].

Ceci nous a motivé à réaliser ce mémoire qui a pour objectif primordial d'effectuer une analyse comparative du protéome salivaire des enfants atteints de l'APLV et du sujet témoin, en utilisant la technique d'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE afin d'explorer des biomarqueurs potentiels qui pourraient être utilisés pour le diagnostic et même le pronostic de cette pathologie.

Notre première partie présentera une synthèse des éléments nécessaires pour appréhender l'allergie aux protéines du lait de vache. Nous faisons également le point sur la salive et ses composants ainsi que les biomarqueurs et leur classification.

Puis en deuxième partie de ce manuscrit, nous décrivons le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées afin d'achever notre étude.

Nos résultats et leur discussion sont présentés dans la troisième partie.

En dernière partie, une conclusion résumant l'objectif, les contributions et résultats principaux de notre travail ainsi que des perspectives de recherche en futur sont présentés.

Synthèse
Bibliographique

CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique

I. L'allergie aux protéines du lait de vache

I.1. L'allergie

I.1.1. Définition

L'allergie se définit comme l'ensemble des manifestations cliniques liées à une réponse immunologique, dépendante des anticorps IgE, dirigés contre des allergènes. Plus simplement, l'allergie correspond aux signes cliniques en rapport avec une réaction impliquant les anticorps de l'allergie [41].

I.2.2. Types d'hypersensibilités

Selon la classification de Gell et Coombs, il existe quatre types d'hypersensibilité :

I.2.2.1. Hypersensibilité de type I

Correspond à des réactions médiées par les immunoglobulines E (IgE). Après un premier contact antigénique induisant la production d'IgE spécifiques dirigées contre l'antigène, l'antigène soluble est reconnue à l'occasion d'un second contact par les IgE spécifiques qui vont se lier à leur récepteur de haute affinité (FcεRI) placé à la surface des mastocytes. Cette liaison va provoquer l'activation et la dégranulation des mastocytes. Celle-ci libère différents médiateurs tels que l'histamine et provoque l'apparition de symptômes tels qu'une rhinite allergique, un asthme, une urticaire ou un choc anaphylactique.

I.2.2.2. Hypersensibilité de type II

Est un mécanisme cytotoxique, médié par les IgG. Cette réaction cytotoxique va être dirigée contre la membrane des globules rouges, des globules blancs ou des plaquettes. Elle pourrait également se diriger contre les précurseurs des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, induisant une anémie hémolytique, une leucopénie ou une thrombopénie. Il peut également s'agir d'anticorps dirigés contre d'autres récepteurs cellulaires tels que les récepteurs de la thyroïde (anticorps anti-thyroglobuline) qui seront alors responsables d'une thyroïdite auto-immune.

I.2.2.3. Hypersensibilité de type III

Est lié à la présence de complexes immuns circulants. Ces complexes immuns pourraient se lier à la cellule endothéliale et provoquer l'activation du complément. Les symptômes classiquement associés à ces phénomènes sont les vascularites immunoallergiques [8].

I.2.2.4. Hypersensibilité de type IV

Est lié à des phénomènes d'immunité cellulaire. Il existe différents mécanismes faisant intervenir les lymphocytes T CD4 avec une réponse Th1 ou Th2, ou les lymphocytes T CD8. Les manifestations cliniques sont extrêmement variables : psoriasis, dermatite atopique, mais aussi diabète, asthme allergique chronique (Figure 01) [8].

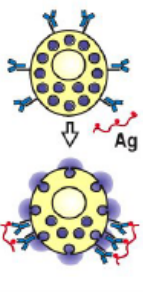
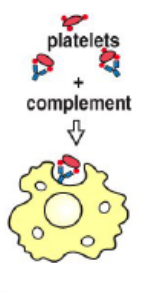
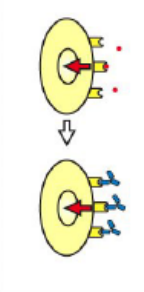
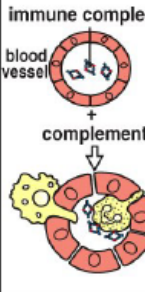
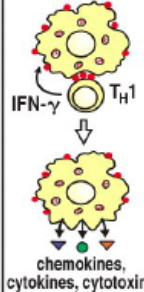
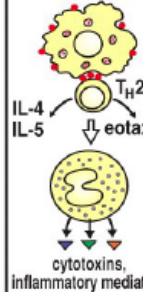
Type I	Type II		Type III	Type IV		
IgE	IgG		IgG	CD4 Th1	CD4 Th2	CD8 cytotox.
Antigènes solubles	Ag cellulaires ou matriciels	Récepteur cellulaire	Ag solubles	Ag soluble	Ag soluble	Ag cellulaire
Mastocyte	Complément, Phagocytes, NK	Ac altère la signalisation	Complément, Phagocytes	Macrophage	Eosinophiles	Cytotoxicité
						
Rhinite all. Asthme all. Choc anaph. Anaphylaxie	Cytopenies medic. Réaction transfus. Anémie hémolytique	Thyroidite Myasthénie	Maladie sérique Lupus érythémateux	(IDR tuberculine) Rejet de greffes Arthrite Diabète	Asthme all. chr. Rhinite all. chr.	*Rejet de greffes °Diabète type I
Urticaire de contact	Pemphigus Pemphigoïde	Urticaire chronique Pemphigus	Vascularites immunoall.	Psoriasis	Dermatite atopique	Eczéma all.de contact Vitiligo Pelade

Figure 01 : Classification des hypersensibilités selon Gell et Coombs [37].

I.2. Allergie alimentaire

I.2.1. Définition

L'allergie alimentaire correspond à l'ensemble des manifestations cliniques secondaires à une réponse immunologique vis-à-vis à un allergène alimentaire (trophallergène). Elle correspond à une perte de la tolérance immunologique au trophallergène ; elle est le plus souvent IgE-dépendante mais d'autres mécanismes immunologiques sont possibles [46].

I.2.2. Les allergènes alimentaires

Les allergies alimentaires sont de plus en plus fréquentes. Elles concernent trois enfants pour un adulte. Les signes cliniques sont multiples, pouvant aller jusqu'au décès. Chez l'enfant, cinq aliments sont responsables des trois quarts des allergies alimentaires : Lait de vache, œuf de poule, cacahuète (ou arachide), poisson et moutarde (tableau 01) [41].

Tableau 01 : Répartition des allergènes alimentaires chez l'enfant [41].

Groupe 1	82 %
Œuf	51,8%
Arachide	34,3%
Lait de vache	11,6%
Moutarde	8,9%
Poisson	7,1%
Groupe 2	5,9%
Crevette, noisette, kiwi, blé	
Groupe 3	8,9%
Pois, lentilles, porc, bœuf, amande, soja, crabe, saumon, Vanille, vanilline, piment, fenouil, pomme, mandarine, Cerise, banane, poulet, sésame	
Groupe 4	3%
Lapin, rognon de porc, poivre, canard, bulot, sardine, truite, langouste, noix de cajou, noix du brésil, ail, céleri, coriandre, avocat, pêche, levure de boulanger	

I.3. Allergie aux protéines du lait de vache

3.1. Définition

L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) est la première allergie alimentaire à apparaître chez l'enfant [1].

Elle est considérée comme une réponse exagérée du système immunitaire à un antigène normalement inoffensif, à savoir, les protéines du lait de vache [7].

Les allergènes du LV ont la dénomination Bos d pour *Bos domesticus*. Le LV contient environ une vingtaine de protéines potentiellement allergisantes (tableau 02) [22].

Tableau 02 : Les allergènes du lait de vache, Bos domesticus [53].

Protéines	Allergènes identifiés	teneur	Poids moléculaire (KDa)
Caséines	α S1-caséine α S2-caséine β -caséine K-caséine	50 % des caséines 5 % des caséines 30% des caséines 15% des caséines	20à30
Protéines du lactosérum	β -Lactoglobuline Bos d 5 α -Lactalbumine Bos d 4 Sérumalbumine Bos d 6 Autres	9 % des protéines totales 4 % des protéines totales 1 % des protéines totales	18,3 14,2 67 4
Immunoglobulines Lactoferrine	Bos d 7		160

I.3.2. Physiopathologie

L'APLV se déclare majoritairement chez le nourrisson, au sevrage de l'allaitement maternel. Les manifestations cliniques sont variées et dépendent du caractère immunologique ou non de l'allergie (figure 02) [39].

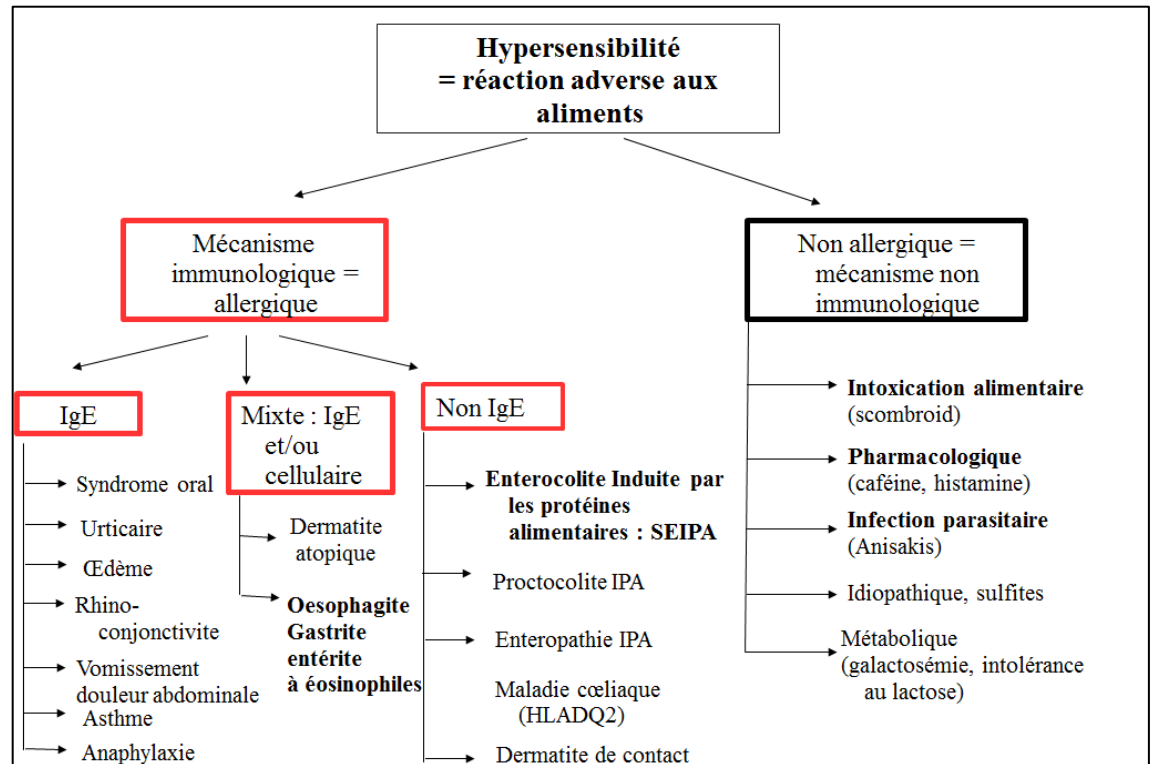


Figure 02 : Classification des allergies alimentaires adaptée [39].

Dans l'APLV IgE médiée, lors du premier contact, les allergènes sont présentés par les cellules dendritiques aux lymphocytes T naïfs, qui, dans un environnement cytokinique Th2 (IL4), vont se différencier en CD4 Th2 activés. Ceux-ci vont à leur tour activer les lymphocytes B, entraînant une induction de leur différenciation terminale en plasmocytes sécrétant d'IgE spécifiques d'allergène. Ces IgE vont se fixer sur leur récepteur spécifique FcεRI sur les mastocytes et basophiles. Lors du deuxième contact, les allergènes se fixent sur les IgE elles-mêmes fixées sur leur récepteur spécifique, et le pontage de deux IgE délivre un signal d'activation à la cellule cible qui pourra libérer ses médiateurs responsables des symptômes de l'allergie (figure 03).

Les réactions allergiques IgE médiées seront donc immédiates, et pourront toucher la peau (angioedème, urticaire), les muqueuses ORL, respiratoires et digestives [39].

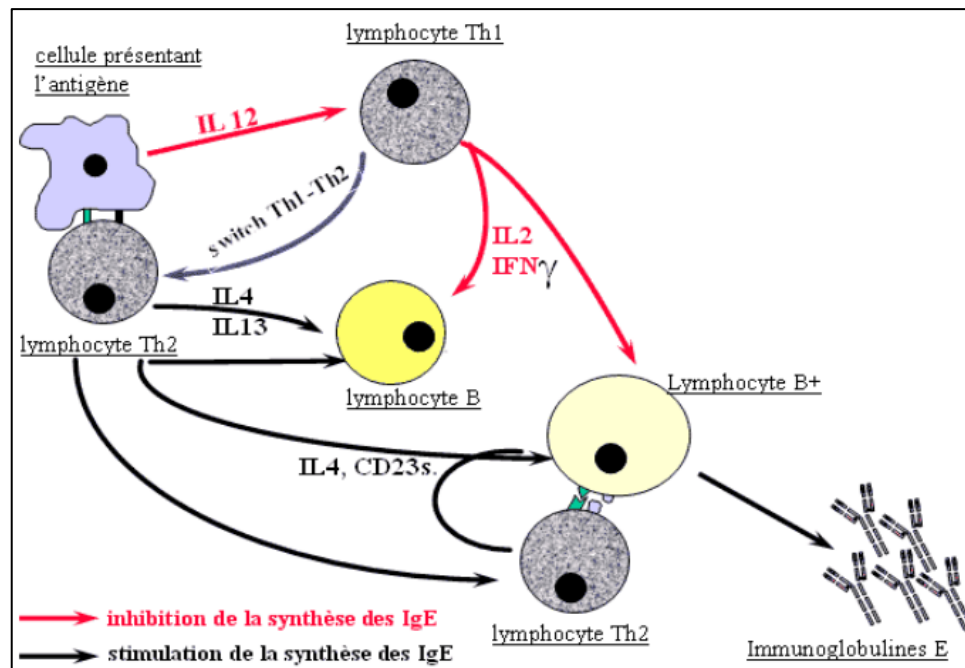


Figure 03 : cascade immunologique Th1 et Th2 après exposition allergénique [39].

I.3.3. Les symptômes

Les enfants présentant une ALPV peuvent avoir des symptômes digestifs, cutanés, et respiratoires.

Selon l'OMS les réactions cutanées sont les plus courantes, il s'agit d'une urticaire, un eczéma, un œdème de Quincke. Les symptômes sont liés à l'ingestion du lait de vache.

L'anaphylaxie est la forme la plus sévère de l'APLV. Il s'agit d'une réaction allergique généralisée potentiellement mortelle. Typiquement, les symptômes allergiques surviennent dans les minutes suivant la consommation de lait de vache. Ils comprennent des signes cutanés associés à l'atteinte d'un ou plusieurs autres organes cibles : tractus gastro-intestinal, voies respiratoires et/ou système cardiovasculaire.

Les réactions gastro-intestinales concernent l'appareil digestif, de la bouche à la partie terminale du colon. Le premier signe est un prurit des lèvres, parfois associé à un gonflement des lèvres, de la langue, et à une sensation de serrement dans la gorge. Les symptômes impliquant l'estomac et l'intestin supérieur sont les nausées, les vomissements et les douleurs. Les symptômes impliquant la partie inférieure des voies intestinales sont les douleurs abdominales, la diarrhée et parfois du sang dans les selles [2].

Les symptômes respiratoires sont rarement isolés dans l'APLV. Mais un prurit nasal, une obstruction nasale, des éternuements, surviennent chez environ 70 % des enfants qui ont un test

de provocation par voie orale au lait de vache positif. Autres symptômes respiratoires peut être signalés une respiration sifflante. Dans l'allergie alimentaire, l'asthme est responsable des réactions très sévères et mortelles. L'asthme et la rhinite peuvent se développer après l'ingestion de lait, mais aussi après l'inhalation de poudre de lait ou de vapeurs de lait bouillant [2].

II. La salive

II.1. Définition

La salive est un liquide biologique essentiel au maintien de la santé buccodentaire et au bon déroulement de nombreuses fonctions orales (mastication, gustation, digestion, phonation..)[10].

Le volume total de salive sécrétée par jour est de 0,5 à 1,0 L, avec une moyenne de 0,6 L [31].

C'est un liquide aqueux, incolore, translucide et dont la viscosité dépend de sa sécrétion [50].

Sa production est assurée, dès le huitième mois in utéro, par un ensemble de glandes salivaires.

II.2. Composition biochimique de la salive

La salive totale, appelée également fluide oral, est composée de tous les fluides sécrétés par les glandes salivaires principales et accessoires, du fluide gingival, du transsudat des muqueuses buccales, des bactéries sessiles non adhérentes, du mucus provenant des fosses nasales et du pharynx, des restes alimentaires, des cellules épithéliales desquamées de la muqueuse buccale, de cellules sanguines et des traces de divers médicaments et produits chimiques[15].

Elle est composée à 99 % d'eau, le 1 % restant est représenté par des constituants inorganiques et organiques [16].

II.2.1. Constituants inorganiques

II.2.1.1. Compartiment gazeux

Comme tous les fluides biologiques, la salive contient de l'oxygène, de l'azote et de l'anhydride carbonique. Il existe des variations de la concentration d'oxygène selon l'endroit de la cavité buccale ; ceci explique la prédominance des bactéries anaérobies au niveau de la plaque et des sillons gingivo-dentaires plutôt que sur la langue.

L'oxygène O₂ est présent en quantité très infime (environ 0, 2%). L'azote N₂ ne représente que 0,9% du volume [4].

Le gaz dissous le plus important est le dioxyde de carbone CO₂ puisqu'il est présent à 20 ou 30% du volume salivaire basal mais peut augmenter jusqu'à 40% lors de la stimulation de la salive. IL existe une partie liée aux protéines (environ un quart) et une partie libre, en équilibre constant

avec le carbonate et l'acide carbonique. De cet équilibre dépend le pH salivaire et le pouvoir tampon du couple carbonate-acide carbonique. Le CO_2 va donc influencer le milieu buccal [4].

II.2.1.2. Éléments minéraux

Les principaux constituants inorganiques de la salive sont les ions sodium, potassium, calcium, magnésium, chlorure, bicarbonate, phosphate, thiocyanate et fluorure. Parmi ces constituants, le sodium, les chlorures et les bicarbonates ont une concentration salivaire inférieure à la concentration plasmatique, à l'inverse du potassium, du calcium, des phosphates inorganiques, et des thiocyanates (Tableau 4).

Les concentrations d'électrolytes sont influencées par des facteurs tels que le type de glande, le débit salivaire, la durée de la stimulation, la rythmicité biologique, la nature du stimulus et de diverses hormones [14].

Les ions H^+ sont responsables du pH salivaire et sont tamponnés par différentes substances, en particulier les bicarbonates [16].

Le bicarbonate permet le tamponnage, tandis que le calcium et le phosphate permettent le maintien de l'intégrité minérale des dents.

Il est intéressant de noter que le pH et la composition ionique de la salive peuvent influencer sur l'activité de certains composants organiques. Par exemple, l'activité du lysozyme est influencée par les anions de faible densité de charge : les thiocyanates, anions nécessaires à l'activité des peroxydases, peuvent ainsi potentialiser l'activité du lysozyme (Tableau 03) [17].

Tableau 03 : Concentrations en électrolytes (en *mmol/l*) au niveau du plasma et de la salive mixte en condition de stimulation ou non [3].

Les ions	Plasma	Salive mixte non stimulée	Salive mixte Stimulée
Na^+	145	5	20-80
K^+	4	22	20
Ca^{2+}	2.2	1-4	1-4
Cl^-	120	15	30-100
HCO_3^-	25	5	15-80
PO_4^{3-}	1.2	6	4
Mg^{2+}	1.2	0.2	0.2
SCN^-	<0.2	2.5	2
NH_3^+	0.05	6	3

Na^+ : Sodium ; K^+ : Potassium ; Ca^{2+} : Calcium ; Cl^- : Chlore ; HCO_3^- : Bicarbonate ; PO_4^{3-} : Phosphate ; Mg^{2+} : Magnésium ; SCN^- : Thiocyanate ; NH_3^+ : Ammoniaque.

II.2.2. Constituants organiques

Les protéines en sont le principal composant organique (tableau 04) et leur concentration augmente avec le débit salivaire, un litre de salive contient environ 2,5 grammes de protéines [51].

Plus de 3000 protéines ont été identifiées à ce jour [29].

Les protéines salivaires sont classées en fonction de leur origine en :

- protéines extrinsèques (plus de 2000 composants), provenant du sang par différentes voies de diffusion ou de transport actif
- protéines intrinsèques synthétisées localement par les glandes salivaires (environ 400 composants) [51].

II.2.2.1. Protéines extrinsèques : issues du sérum. Elles sont représentées par des albumines d'origine sérique (5 % à 10 % des protéines totales), des IgA, IgG, IgM, des a- et b-globulines, des calprotectines ou d'autres protéines du système immunitaire, etc. Leur concentration (20 % des protéines totales) décroît lorsque le débit salivaire augmente [36].

II.2.2.2. Protéines intrinsèques : synthétisées par les glandes salivaires elles-mêmes.

- **Enzymes salivaires**

- ✓ **Alpha-amylase salivaire (ou ptyaline) :**

L' α -amylase est une enzyme abondante produite principalement par les cellules séreuses de la glande parotide, mais également par les glandes sublinguales, sous-maxillaires et mineures. La concentration en α -amylase dans la salive humaine varie de 0,04 à 0,4 mg / ml et peut représenter jusqu'à 5% de la protéine salivaire totale. L' α -amylase salivaire est une enzyme de la famille des α -1,4-glucanes-4 glucanohydrolases, qui catalyse l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glycosidiques de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides. La digestion enzymatique initiale de l'amidon alimentaire commence dans la cavité buccale avec la libération de maltose et de maltodextrine [36].

- ✓ **Lipase salivaire**

Produite principalement par les glandes linguales, mais également par les glandes sublinguales, cette enzyme hydrolyse les triglycérides, les phospholipides, les esters de cholestérol et autres esters [13].

- ✓ **Lysozyme**

Cette enzyme va lyser la paroi cellulaire au niveau des liaisons $\beta(1,4)$ glycosidiques des peptidoglycans membranaires des bactéries Gram⁺ et des germes fongiques. Les bactéries

Gram⁻ qui possèdent une couche externe de lipopolysaccharides (LPS) sont généralement résistantes à l'action de cette enzyme.

✓ Peroxydases

Les peroxydases présentes dans le fluide oral ont deux origines. Les glandes salivaires fabriquent et sécrètent une peroxydase dite salivaire, encore appelée lactoperoxydase salivaire (LPO), tandis que le fluide gingival apporte une myéloperoxydase (MPO) synthétisée par les polynucléaires neutrophiles. Ces enzymes catalysent l'oxydation du thiocyanate par l'eau oxygénée (H₂O₂) ce qui aboutit à la formation d'hypocyanite, composé fortement oxydant, qui va dénaturer les protéines essentielles au métabolisme des bactéries. Les peroxydases inhibent ainsi la croissance de nombreuses bactéries (Gram⁺ et Gram⁻) mais vont également être actives sur les levures et les virus [13].

- **L'anhydrase carbonique (gustine)**

Sécrétée par les cellules séreuses des glandes submandibulaires et parotidiennes. C'est elle qui assure le pouvoir tampon de la salive [21].

- **Autres enzymes**

Il existe un très grand nombre d'autres enzymes comme les kallikréines, les collagénases d'origine tissulaire, les gélatinases, les élastases, les protéases, les cholinestérases et les ribonucléases. Elles jouent principalement un rôle antimicrobien et de digestion des substrats [16].

- **Protéines riches en proline**

La famille des protéines riches en proline (PRP) représente chez l'homme près des deux tiers du total des protéines de la salive parotidienne (1,251-230 µg/ml) et submandibulaire (1,335-270 µg/ml). Les PRP salivaires sont classés comme acides (PRP-a), basiques (PRP-b) et basiques glycosylées (PRP-g). Les PRP acides contribuent au maintien de l'homéostasie du calcium dans la cavité buccale. Les PRP basiques glycosylées agissent comme lubrifiant. Le rôle des PRP basiques n'est pas encore bien compris ; leur rôle serait de protéger le tractus gastro-intestinal des effets toxiques des tanins. Plus de 11 PRP basiques et plus de cinq isoformes acides ont été identifiées chez l'homme [28].

- **Histatines**

Les histatines sont des petites protéines riches en histidine, sécrétées par les glandes parotides, submandibulaires et sublinguales. Leurs formes prédominantes sont l'histatine 1, 3 et 5. L'histatine 1 contient une sérine phosphorylée au niveau du résidu 2. Les histatines 1 et 3 sont

produites par deux gènes différents. Les histatines mineures 2, 4, et 5 à 12 proviennent du clivage protéolytique post-traductionnel des histatines 1 et 3. Les histatines auraient une activité antifongique. Leur concentration est maximale dans les sécrétions parotidiennes et submandibulaires (entre 30 et 150 µg/ml) ; dans la salive totale, elle est de seulement 2 à 4 µg/ml [28].

- **Stathérines**

Les stathérines sécrétées par les glandes parotides (16-147 µg/ml) sont riches en résidus tyrosine et tyrosine phosphorylée en ser-2 et ser-3. Plusieurs variantes ont été identifiées, issues à la fois d'un épissage alternatif et de modifications post-traductionnelles. Les stathérines sont les seules protéines salivaires capables d'inhiber la précipitation spontanée des phosphates de calcium dans une salive sursaturée. Les stathérines ont aussi un rôle de lubrification des surfaces dentaires [28].

- **Cystatines**

Les cystatines salivaires sont sécrétées par les glandes salivaires parotides (1,2-1,6 µg/ml), submandibulaires et sublinguales (92-130 µg/ml). Les cystatines sont des inhibiteurs naturels des protéases à cystéine. Leur rôle serait de protéger les tissus buccaux de ces enzymes [28].

- **Mucines**

Approximativement 16 % du total des protéines présentes dans la salive mixte sont de la famille des glycoprotéines mucines.

On distingue deux grandes familles de mucines :

- MG1 (molécules à poids moléculaire élevé, supérieur à 1 MDa), produite par les cellules à mucus.
- MG2 (molécules à bas poids moléculaire, compris entre 200 et 250 KDa).

Les mucines sont constituées de 70 à 80% des glucides et leurs principales fonctions est dans la lubrification, l'hydratation et la protection de la cavité buccale. Dans la lubrification, elles agissent comme une barrière empêchant la pénétration d'irritants potentiels, tels que les toxines et les protéases bactériennes. Les mucines jouent également un rôle dans la mastication, la parole et la déglutition, ainsi que dans la liaison aux tissus buccaux durs et mous et aux microbes agglutinants [28].

- **Lactoferrine**

La lactoferrine est une glycoprotéine lie deux atomes de fer et sa fonction antimicrobienne peut être liée à sa capacité à séquestrer le fer. C'est une protéine multifonctionnelle ayant des activités antibactériennes, antivirales et anti-tumorales ; régulation de la croissance et de la différenciation cellulaires ; activités anti-inflammatoires; et modulation de la réponse immunitaire. Les autres activités rapportées comprennent l'activité protéolytique, l'inhibition des formations de biofilms bactériens et la promotion de la croissance osseuse [28].

- **Défensines**

Les défensines sont une famille de peptides antimicrobiens. Ces protéines interviennent également dans la régulation du volume cellulaire et du chimiotactisme et ont aussi une action inhibitrice sur l'activité des cellules *Natural Killer* (NK). Elles sont habituellement présentes dans le plasma, la moelle osseuse, les intestins et la peau. On retrouve néanmoins dans la salive humaine les défensines de type HNP-1, HNP-2, HNP-3, ainsi que les b-1 et b-2 défensines [28].

- **Immunoglobulines sécrétoires**

Les immunoglobulines salivaires sont des anticorps muqueux qui agissent comme première ligne de défense, elles composent environ 5 à 15% des protéines salivaires entières. L'immunoglobuline A (IgA), fait partie des immunoglobulines les plus présentes, le reste appartenant aux sous-classes IgG et IgM. L'IgA neutralise les toxines et les enzymes bactériennes, interfère avec l'adhérence des bactéries à la surface dentaire en bloquant physiquement les adhérences bactériennes, inhibant le métabolisme bactérien, réduisant l'hydrophobie des bactéries et agrégeant ou agglutinant les bactéries, ce qui contribue à l'action antibactérienne de la salive [25].

- **Autres composants organiques**

La salive contient des facteurs de croissance, principalement le « nerve growth factor» NGF et « l'épithélial growth factor » EGF dont la sécrétion augmente lors des maladies parodontales. Des « insuline-like growth factor » IGF sont également retrouvés [4]. Des cytokines, pourtant présentes préférentiellement au niveau des glandes, peuvent passer au niveau salivaire : interleukine (IL) 2, 4, 6, 10, interféron (IFN) γ , et transforming growth factor (TGF)- β .

On retrouve en faible concentration de l'urée, du glucose, de la créatinine, du cholestérol.

Plus de 3000 acides ribonucléiques ARN messagers ont été identifiés, leur dosage pourrait être un futur marqueur diagnostique des cancers de la sphère buccale.

Les hormones stéroïdiennes, lipophiles, évoluent dans les sécrétions salivaires à des taux plus bas que dans le plasma, mais de façon tout à fait proportionnelle (Cortisol, progestérone, œstradiol, testostérone, etc.).

Certaines de ces hormones sont soupçonnées moduler la croissance de certains germes [4].

Tableau 04 : Liste non exhaustive des protéines salivaires dans la salive entière et leur concentrations dans les glandes salivaires majeures (parotide, sous-maxillaire-sublinguale ou SMSL [28]).

composants	Niveau de concentration dans la salive (µg/ml)		
	Salive totale	parotide	SMSL
Albumine	29-238	-	-
Amylase	380-500	650-2,600	
Cystatine	240-280	1,6-4	92-280
fibronectine	0,2-2	2-6	0,3-2,0
histatines	2-30	30-55	13-70
IgG	0,4-14,4	-	-
Lactoferrine	194	12	13
lysozyme	-	7	21
MG1	80-500	-	80-560
MG2	10-200	-	5-243
β-2-Microglobuline	-	0,2-0,9	0,3-0,4
Agglutinin parotide	-	10	-
Protéines riche en proline	90-180	230-1,251	270-1,335
sIgA	19-439	20-230	41-56
Statherine	2-12	16-147	20-150

III. Biomarqueurs

III.1. Définition et classifications

III.1.1. Définition

Les premières apparitions du terme biomarqueur dans la littérature sont relativement récentes. On le trouve par exemple dans une publication de 1980 intitulée « *Serum UDP-galactosyl transferase as a potential biomarker for breast carcinoma* », et dans un brevet déposé en 1982 portant sur une méthode enzymatique pour la détection de biomarqueurs de diagnostic.

Toutefois, l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments et l'institut national de la santé (The FDA/NIH Biomarker Working Group) ont défini un biomarqueur comme « ...Il s'agit d'une caractéristique mesurée qui constitue un indicateur de la réalisation des processus normaux, pathogènes ou de la présence de réponses à une exposition ou une intervention, y compris les interventions thérapeutiques. Les caractéristiques moléculaires, histologiques, radiographiques ou physiologiques sont des types de biomarqueurs. Un biomarqueur n'est pas une évaluation de la façon dont un individu se sent, fonctionne, ou survit » [9].

Une autre définition plus spécifique, proposée celle-ci par le National Cancer Institute, caractérise un biomarqueur comme « une molécule biologique se trouvant dans le sang, les autres fluides corporels ou les tissus, signe d'un processus normal ou anormal, d'un état physiologique ou pathologique. Un biomarqueur peut être utilisé pour suivre l'effet du traitement d'une pathologie. On les appelle également marqueurs ou signatures moléculaires. » [34].

III.1.2. Classifications possibles

Les biomarqueurs constituent un vaste domaine. Ils se présentent sous différentes formes et trouvent des utilisations diverses.

Les moyens de classification de marqueurs biologiques sont variés, eux aussi. Des réflexions ont été menées par des équipes de chercheurs, ainsi que par des instituts de santé tels que le National Institute of Health, qui décrit trois types de biomarqueurs (tableau 05).

Toutefois, ce n'est qu'une classification parmi bien d'autres. Nous détaillerons ci-dessous les principales méthodes rencontrées dans la littérature [20,44].

Tableau 05 : Classification des biomarqueurs selon le NIH, d'après [20,44].

Terme	Définition
Biomarqueur de type 0	Marqueur biologique de la progression de la maladie relié à un paramètre clinique connu.
Biomarqueur de type I	Marqueur biologique qui reflète les effets d'une thérapeutique selon son mécanisme d'action.
Biomarqueur de type II	Marqueur biologique considéré comme un critère de substitution : une modification de ce biomarqueur est associée à un bénéfice clinique ou à un risque.

III.2. Nature des biomarqueurs

Alors que les marqueurs utilisés autrefois consistaient en des indicateurs physiologiques tels que la température, le poids, la pression sanguine ou le rythme cardiaque, les progrès techniques en matière d'analyse génétique, protéique et cellulaire ont rendu accessibles de nouveaux types de biomarqueurs [11].

- **Biomarqueurs génomiques**

On désigne sous le terme biomarqueur génomique une caractéristique mesurable de l'ADN ou de l'ARN. Il peut s'agir d'une mesure de l'expression, de la fonction, ou encore de la régulation d'un gène. Les caractéristiques de l'ADN comprennent entre autres les polymorphismes mononucléotidiques (SNPs), les modifications de l'ADN comme la méthylation, et les délétions ou insertions d'un ou plusieurs mononucléotides. L'étude des ARN permet de fournir, par exemple, les niveaux d'expression de ces ARN, leurs séquences, ou bien de détecter d'éventuelles modifications, telles que l'épissage et l'édition [35].

- **Biomarqueurs protéomiques**

Le protéome désigne l'ensemble des protéines d'une partie de cellule, d'une cellule entière ou d'un groupe de cellules, à un moment donné et dans des conditions données. Le protéome est dynamique : il varie spatialement et temporellement [11].

Les enjeux de la protéomique sont multiples : identifier les protéines, déterminer leurs structures, leurs localisations, leurs fonctions (qui peuvent varier en fonction des contextes cellulaires), leurs éventuelles interactions avec d'autres protéines, ou encore comprendre les mécanismes impliqués dans les grandes fonctions cellulaires [49].

- **Biomarqueurs métabolomiques**

La métabolomique est l'étude des métabolites présents dans un système biologique à un instant donné. L'ensemble des métabolites est variable selon les espèces, mais aussi en fonction du temps, de l'environnement, d'un état physiologique ou pathologique. Ainsi, certains métabolites (ex : glucose, cholestérol, créatinine, urée, triglycérides, etc.) sont utilisés comme biomarqueurs [11].

III.3. Application des biomarqueurs

Une autre classification très utilisée se rapporte à l'application des biomarqueurs, autrement dit à la finalité de leur utilisation.

- **Biomarqueurs liés aux pathologies**

On distingue une classe de biomarqueurs aidant à identifier des prédispositions à développer une pathologie grâce à l'étude de facteurs héréditaires [3].

Il existe également des biomarqueurs liés au diagnostic, qui permettent de détecter la présence d'une maladie chez un sujet.

On distingue une autre classe qui concerne les biomarqueurs pronostiques. Ils aident à déterminer l'évolution prévisible de la maladie et à évaluer le niveau de risque. Ces biomarqueurs sont associés à la survie du patient, indépendamment du traitement, et permettent de savoir qui traiter. Ils donnent également la possibilité de classer les patients en fonction du stade de la maladie.

On trouve une classe de biomarqueurs dits « physiopathologiques » qui permettent à la fois d'améliorer les connaissances des mécanismes biologiques et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette catégorie comprend les biomarqueurs mécanistiques et les biomarqueurs de stade [49].

- **Biomarqueurs liés aux traitements**

Une autre classe de plus en plus utilisée regroupe les biomarqueurs prédictifs de l'effet thérapeutique. Ils permettent de prédire l'efficacité ou la toxicité d'un traitement en particulier, et de savoir quels patients sont susceptibles ou non de bénéficier de ce traitement.

L'approche thérapeutique liée à l'utilisation de ces biomarqueurs prédictifs est de type « médecine stratifiée », également appelée « médecine personnalisée » par abus de langage (l'approche reste en effet populationnelle et statistique, et non individuelle). On utilise aussi le néologisme « théranostic » – issu de la contraction des termes « thérapeutique » et « diagnostic » – pour qualifier l'utilisation d'un test diagnostique reposant sur un biomarqueur pour orienter la thérapeutique d'un patient.

Enfin, les biomarqueurs ont un rôle à jouer au cours du traitement, avec l'évaluation individuelle de son efficacité ou de sa toxicité. Les résultats de ces évaluations peuvent conduire à des adaptations. Par exemple l'augmentation des dosages, la diminution de la fréquence d'administration ou bien l'arrêt du traitement [49].

III.4. Les Biomarqueurs salivaires

III.4.1. La salive, source de biomarqueurs

La figure 04 illustre les différents constituants de la salive décrits précédemment :

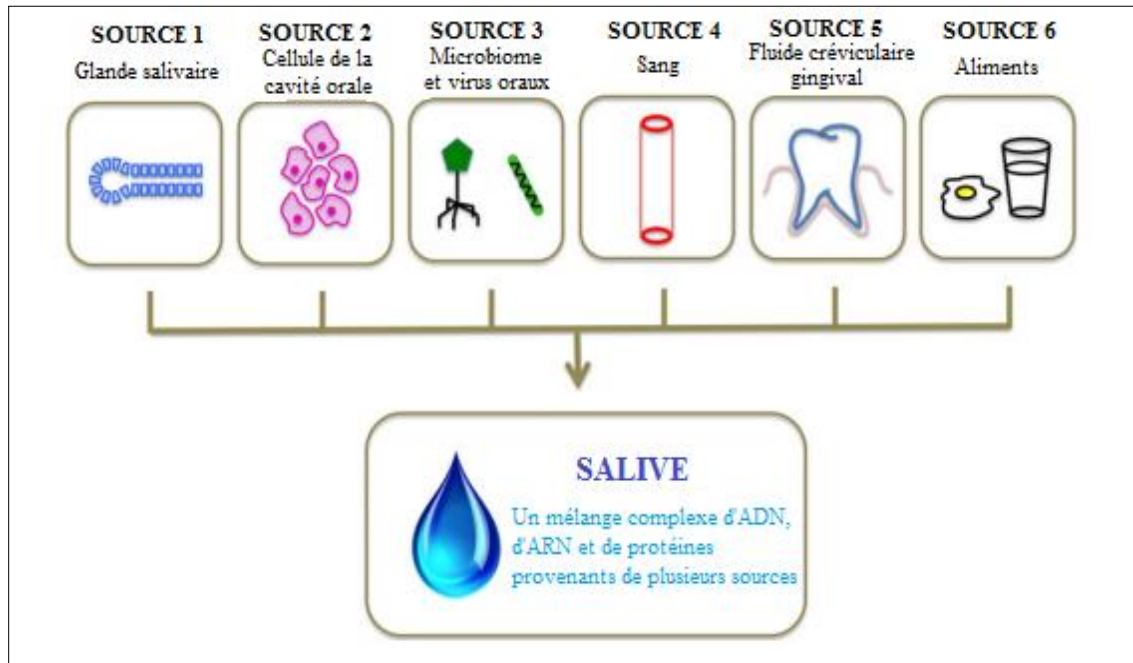


Figure 04 : Constituants de la salive ou fluide oral [55].

Les chercheurs ont identifié le plus grand nombre de protéines dans la salive humaine à ce jour, une découverte préliminaire qui pourrait ouvrir la voie à d'autres tests diagnostiques basés sur des échantillons de salive. De tels tests s'avèrent prometteurs en tant que méthode de diagnostic plus rapide, moins coûteuse et potentiellement plus sûre que le prélèvement sanguin. On s'intéresse de plus en plus à la salive comme liquide diagnostique, en raison de sa collecte relativement simple et peu invasive. Les mêmes protéines présentes dans le sang sont également présentes dans la salive à la suite d'une fuite de liquide au niveau de la gencive. Il est beaucoup plus facile, plus sûr et plus économique de prélever de la salive que de prélever du sang, surtout chez les enfants et les patients âgés. Bien que les tests de salive ne remplacent pas les tests sanguins pour toutes les applications diagnostiques, ils pourraient à l'avenir s'avérer une alternative potentiellement salutaire pour détecter les maladies pour lesquelles un diagnostic précoce est essentiel [49].

***Matériel et
Méthodes***

CHAPITRE II : Matériel Et Méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Recrutement des patients

Notre étude a porté sur 14 patients, atteints de l'allergie aux protéines du lait de vache IgE médiée, provenant du service de pédiatrie du CHU de Constantine et du service de pédiatrie d'EHS mère enfant El Mensora Constantine (ils ont été consultés à la polyclinique de Djebel Ouahche). Les patients recrutés sont âgés entre 1 an et 8 ans dont la pathologie est au stade initial ou avancé. Ils sont sous un régime d'éviction des protéines du lait de vache. Cette population a été comparée à un sujet sain, sans pathologie connues et possédant une bonne hygiène buccale.

1.2. Recueil de la salive

Pour le recueil de la salive nous avons adopté la méthode décrite par [26]. 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 dépourvue 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 stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 t/mn 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.

2. Méthodologie de travail

2.1. Extraction des protéines salivaires

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de la salive des patients malades et un sujet sain obtenue après centrifugation de la salive totale.

100µl de salive des patients malades et de sujet sain sont mélangés avec 50µl de solution d'extraction contenant 35 % (v/v) de glycérol, 22 % (v/v) de Tris/HCl 1M pH 6.8, 43 % (v/v) d'eau distillée, 7% (p/v) de SDS et quelques grains de bleu de bromophénol. 2.5% (v/v) de β-mercaptoethanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines salivaires.

Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10000 t/min pendant 2 minutes. Les surnageants contenant les protéines salivaires dissociées et réduites sont récupérés.

2.2. Électrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide

Après l'étape d'extraction, la composition protéique est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur en conditions dénaturantes (présence de SDS), avec un système vertical. L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de [30] modifiée par [47]. Le gel de séparation contient 12,56% de polyacrylamide et le gel d'alignement 2,88%.

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 KDa à 250 KDa. Les échantillons (la salive) sont déposés à raison de 50µl par puits. La migration est effectuée à 40 mA par gel dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1,4 % (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie à 12% (p/v) de TCA et 5 % (v/v) de solution mère de Bleu de Coomassie R250 à 1 % dans l'éthanol. Les gels sont colorés toute la nuit avec la solution de coloration. Ils sont enfin décolorés dans de l'eau de robinet.

2.3. Lecture des électrophorègrammes

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation et de déterminer le poids moléculaire de chaque protéine, un marqueur de taille a été utilisé.

2.4. Analyse statistique

Le traitement des données d'électrophorèse a fait appel à des méthodes statistiques, les fréquences et les indices de similarités ont été effectués à l'aide d'*Excel* 2013. L'établissement des dendrogrammes est réalisé à l'aide du logiciel *statistica* version 6.0.

Résultats Et Discussion

CHAPITRE III : Résultats Et Discussion

III .1. Etude épidémiologique

III .1. 1. Distribution de l'échantillon selon le sexe

La répartition des enfants allergiques par sexe montre que 64,29 % des garçons (9 cas) sont significativement plus touchés que les 35,71 % des filles (5 cas) (figure 5), avec un sex ratio (garçon/fille) de 1,78.

Le sexe masculin semble être associé à un risque plus élevé que le sexe féminin. La même prédominance masculine est donnée par la littérature où le sex-ratio varie de 1,2 à 1,35 en faveur des garçons. La prédominance du sexe masculin est également notée pour les allergies alimentaires en général.

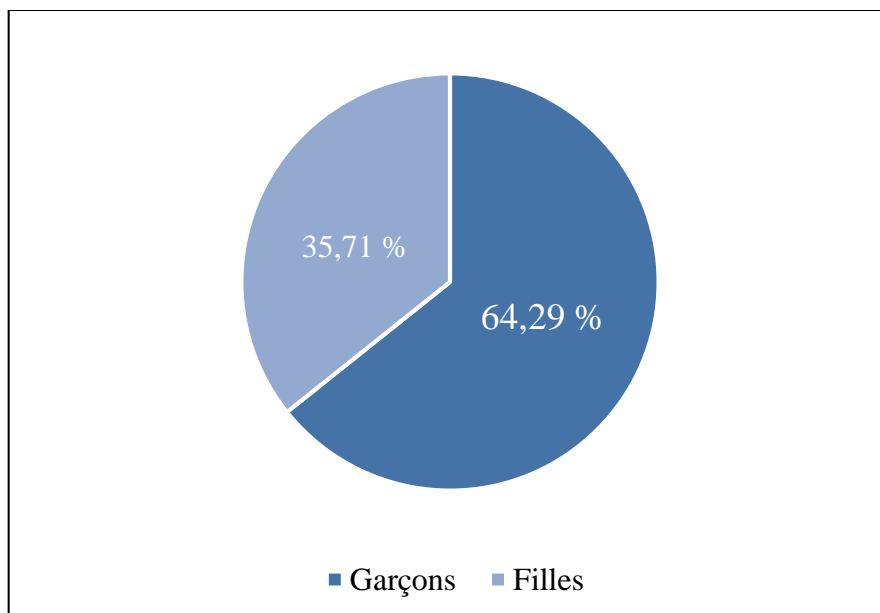


Figure 05 : Répartition de la population selon le sexe.

III .1. 2. Distribution de l'échantillon selon l'âge

La distribution des individus selon la tranche d'âge est représentée dans la figure 6. Les enfants allergiques ont un âge compris entre 1 et 8 ans. L'âge moyen est de 4 ans.

La répartition des patients par tranche d'âge, indique une prédominance de cette pathologie dans la tranche d'âge [4 – 6 ans] avec 35 %, suivie de la tranche d'âge [1 moi -2 ans] avec 28 %, ensuite la tranche d'âge [2 - 4ans[avec 21 % et seulement 14 % âgés entre [6 - 8ans].

Selon [7] L'APLV est l'une des allergies alimentaires les plus fréquentes chez les enfants de moins de cinq ans.

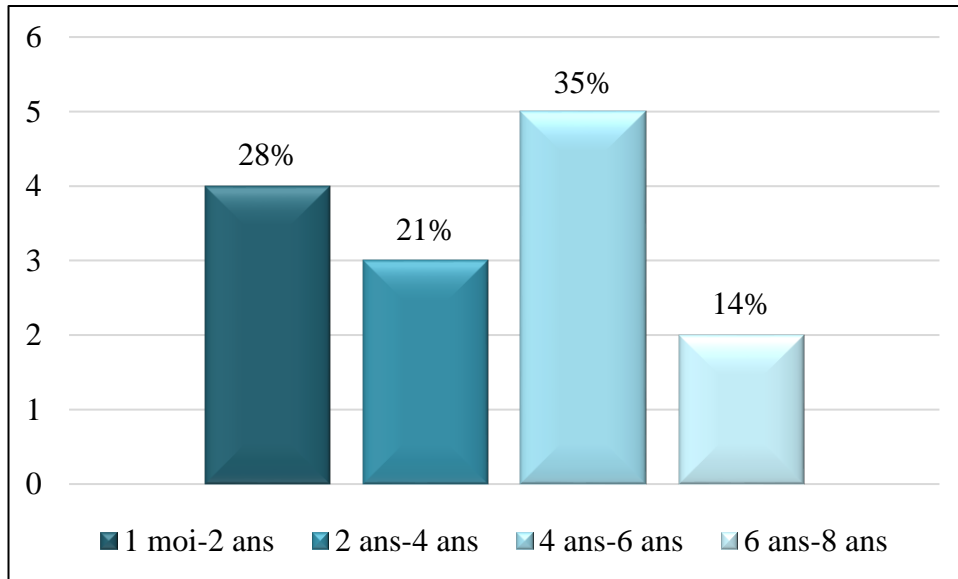


Figure 06 : Répartition de la population selon les tranches d'âges.

III .1. 3. Distribution de l'échantillon selon les maladies associées

La répartition des malades selon les maladies associées est représentée par la figure 7. Nous constatons que la plupart des patients (50%) semblent n'avoir aucune maladie associée à l'APLV. Cependant, dans 32% des cas nous avons remarqué une prédominance d'association de la maladie avec l'asthme. Une distribution similaire est observée chez les patients présentant l'anémie, l'allergie aux arachides et l'allergie au blanc d'œuf avec 6%.

Classiquement, les allergiques au lait de vache développeront d'autres allergies alimentaires (18 % des cas), un asthme (41 % des cas) [54].

D'après [33] est l'un des symptômes observé chez des nourrissons ayant une APLV, notamment après des régimes d'exclusion [52].

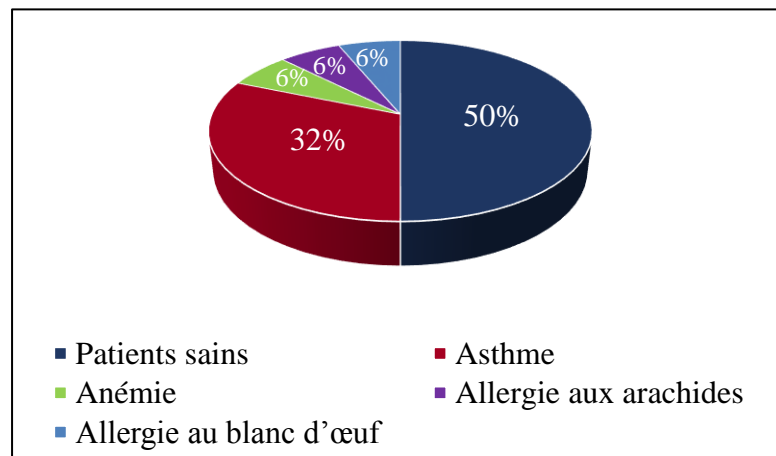


Figure 07 : Répartition selon les maladies associées.

III .1. 4. Distribution selon les antécédents familiaux

Les résultats obtenus à partir de notre enquête montrent que 21,43 % (3 cas) des enfants allergiques avaient au moins un antécédent familial atopique (tableau 06).

Tableau 06 : Répartition des enfants selon les antécédents.

	Antécédents	
	Oui	Non
Effectif	3	11

Le facteur génétique figure parmi les facteurs déterminants de l'apparition de l'allergie. Un enfant de parents atopiques présente plus de risque de développer une allergie. Ceci a été noté par différentes études, qui considèrent l'atopie des parents comme un facteur de risque important. Celle-ci est même considérée comme un moyen de dépistage plus efficace chez les enfants à risque, que la recherche de marqueurs biologiques, comme la détection précoce d'IgE spécifiques.

III .1. 5. Distribution de l'échantillon selon l'âge au diagnostic

Le tableau suivant montre la distribution des patients selon l'âge de la découverte de la maladie.

Tableau 07 : Distribution de la maladie selon l'âge de début de la maladie.

Les tranches d'âge	Effectif (n)	Pourcentage (%)
[Depuis la naissance – 3 mois]	9	64%
[3 mois - 6 mois]	3	21%
[6 mois – 9 mois]	2	14%

L'APLV apparaît à un âge très précoce (tableau 07). Sept cas ont développé une APLV le premier jour de leur vie, ce qui peut nous faire penser à une sensibilisation anténatale. Et sept cas lors du premier mois de vie. Ceci permet de dire que 71,43 % des enfants étudiés ont développé l'allergie au cours des trois premiers mois de leur vie.

Le lait de vache est le premier aliment ingéré par l'enfant si bien que l'allergie aux protéines du lait de vache est généralement la première à apparaître. Ceci a été observé par les différentes études où l'APLV débute le plus souvent chez le nourrisson âgé de moins d'un an.

III.2. Fractionnement des protéines salivaires et recherche de biomarqueurs

III.2.1. Analyse des profils électrophorétiques

La technique adoptée pour l'analyse est celle décrite par [30] et modifiée par [47] 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.

III.2.2. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices

L'analyse des profils électrophorétiques des protéines salivaires des 15 échantillons (14 malades et un témoin), révèle une variabilité dans la composition protéique des témoins et des patients et même entre les patients eux même.

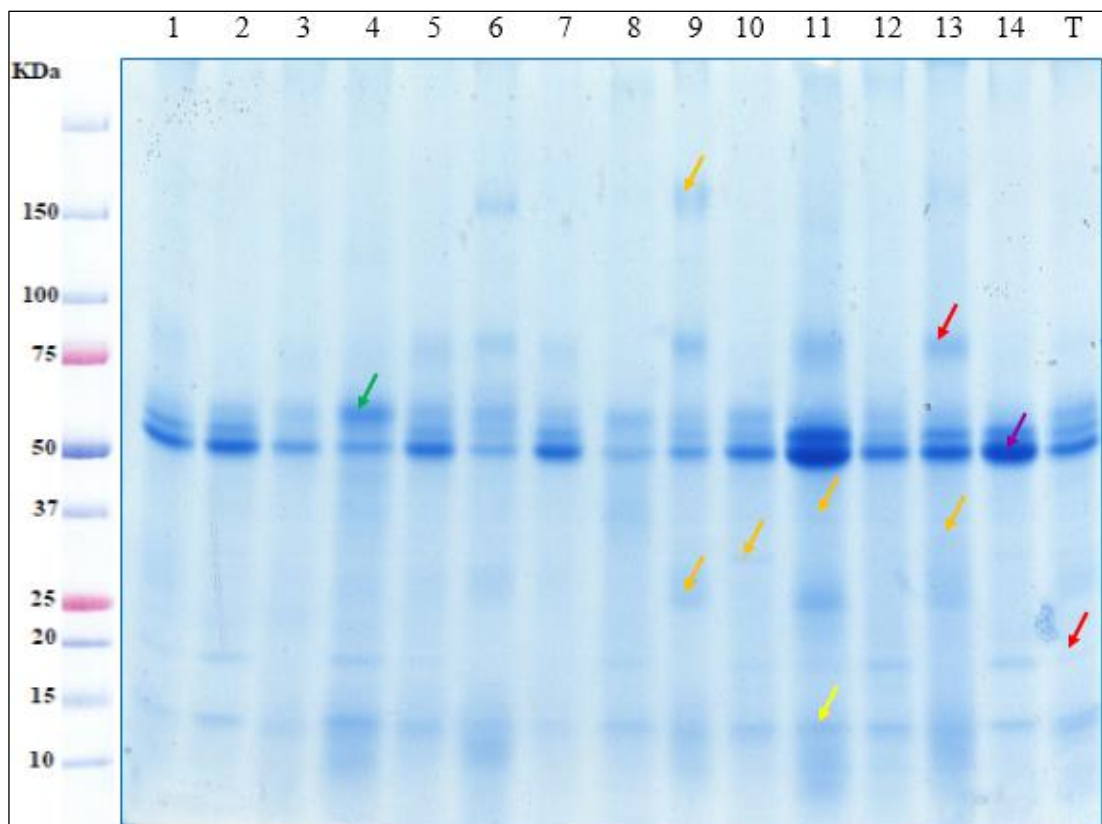


Figure 08 : Fractionnement des protéines salivaires dénaturées et réduites par SDS-PAGE [1 à 14 : des patients, T : témoin].

Cette analyse permet de distinguer 11 bandes protéiques avec des mobilités allant de 2,5 à 11,8 cm, ces protéines sont caractérisées par des gammes de masse moléculaire approximatives de 50-250 KDa

La comparaison entre les profils protéiques des témoins et des sujets malades, montre que certaines bandes protéiques présentent des variations quantitatives et/ou qualitatives.

Un exemple de la variation quantitative peut être illustré par les bandes protéiques 3, 5, et 11. Ces bandes sont présentes chez tous les échantillons (témoin et malades). En effet :

L'intensité de la bande 3 est forte chez le patient 4 tandis que chez les patients 8, 10 et le témoin l'intensité est moyenne, par contre chez les patients 1, 12, et 14 il y a une faible intensité (Flèche verte, figure 08).

Quant à la bande 5, elle est fortement concentrée chez les patients 11 et 14 et faiblement concentrée chez les patients 6 et 8, cependant son intensité est moyenne chez le reste des patients et le témoin (Flèche violette, figure 08). Théoriquement le poids moléculaire de l'albumine est 66,5 KDa donc on peut considérer que la bande protéique 5 située aux alentours de 60 KDa est une albumine (figure 08)

En ce qui concerne la bande 11, elle est faiblement présente chez les patients 1, 3 et 7 est moyennement présentes chez le reste des patients et le témoin (Flèche jaune, figure 08).

Donc les bandes 3, 5, et 11 varient quantitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs quantitatifs.

Pour les variations qualitatives, les exemples les plus importants sont celui des bandes protéiques 1, 6, 7, 8 et 9 dont le poids moléculaire est d'environ 155, 37, 34, 30 et 25 KDa respectivement (flèche orange, figure 08) et sont présentes chez quelques patients et absentes chez le témoin et quelques malades. Donc ces bandes varient qualitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs qualitatives.

La présence de la bande protéique 1 chez les patients 6, 9 et 13 et son absence chez le témoin et le reste des échantillons montre que cette bande peut être considérée ou utilisée comme un biomarqueur. Théoriquement le poids moléculaire de l'IgG est 150 à 170 KDa donc on peut considérer que la bande protéique 1 située aux alentours de 155 KDa est une IgG.

Les autres exemples des variations qualitatives sont ceux des bandes protéiques 2 et 10 dont le poids moléculaire est d'environ 75 et 20 KDa respectivement (flèche rouge, figure 08) et sont présentes chez quelques patients et le témoin et absentes chez quelques malades. A cause de leur présence chez le témoin et leur absence chez quelques patients, ces bandes peuvent être considérées comme des biomarqueurs.

En outre, il faut signaler la présence d'un cas particulier, celui du patient numéro 13 qui présente le nombre le plus important de biomarqueurs ,4 biomarqueurs qui sont absents chez le témoin et un biomarqueur qui est présent chez le témoin et absent chez le malade (tableau 08). Sur le plan clinique, ce patient est dans les premiers mois de la maladie.

Les fluctuations observées entre les profils électrophorétiques des enfants allergiques sont probablement dues à des facteurs tels que : l'âge, le sexe, l'âge au diagnostic, les antécédents familiaux, et les pathologies associées (exemple : le patient 2 et 11) .

La variation de ces derniers est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 08 : diagramme type des protéines

Bandes	Mobilité (cm)	Echantillons														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	T
1	2,5	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
2	5,2	1	0	0	0	1	1	-1	0	1	0	1	0	1	0	1
3	6,25	-1	1	1	+1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	-1	1
4	6,75	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	+1	1	1	+1	1
5	7	1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	+1	1	1	+1	1
6	8,2	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1	0	0
7	8,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0
8	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	0
9	9,5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	-1	0	0
10	10,75	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	-1
11	11,8	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1

1 : présence **0** : absence (+/-) : intensité forte/faible **T** : témoin

III.3. Etude de la variabilité des protéines salivaires

L'étude est faite selon le poids moléculaire et la mobilité des protéines séparées, l'analyse électrophorétique des 15 échantillons a permis de distinguer 11 types de protéines salivaires de mobilités différentes (tableau 09).

Tableau 09 : Variabilités des protéines salivaires en condition dénaturantes et réductrices.

<i>Bandes</i>	<i>Mobilité (cm)</i>	<i>Echantillon</i>	<i>Fréquence %</i>
1	2.5	6, 9,13	20
2	5.2	1, 5, 6, 7, 9, 11,13, T	53,33
3	6.25	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,T	100
4	6.75	1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, T	80
5	7	1, 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,T	100
6	8.2	8, 11, 12,13	26,66
7	8.5	13	6,66
8	9	10, 14	13,33
9	9.5	9,11 ,13	20
10	10.75	1,2, 4, 8, 10, 11, 12, 14, T	60
11	11.8	1, 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13 ,14, T	100

Sur la base de la variabilité des protéique observée les bandes les plus fréquentes sont les bandes 3, 5 et 11 de mobilité 6.25, 7, et 11.8 cm respectivement présentes chez tous les échantillons avec une fréquence de 100%, ces protéines sont les trois protéines salivaires dominantes, suivies par la bande 4 de mobilité 6.75 cm avec une fréquence de 80% retrouvée chez 12 échantillons. Ensuite la bande 10 avec une mobilité de 10.75 cm et une fréquence de 60%, cette bande est présente chez 9 échantillons, par la suite vient la bande 2 de mobilité 5.2 cm et de fréquence 53.33% présente chez 8 échantillons. La bande 6 avec une mobilité de 8.2 cm et une fréquence de 26.66% est rencontrée chez 4 patients, puis les bandes 1 et 9 retrouvées chez 3 échantillons chacune et la bande 8 présente chez 2 échantillons.

La bande 7 est la moins fréquente avec une fréquence de 6.66% et caractérise dans un seul échantillon.

III.4. Classification hiérarchique des protéines salivaires et représentation en dendrogramme

Afin de regrouper les échantillons selon le degré de similarité de leurs compositions protéiques, le fractionnement des protéines salivaires par SDS-PAGE a été traité puis analysé

statistiquement avec le logiciel Statistica à partir de la matrice des diagrammes des patients décrite précédemment (tableau 08) suivant une approche par classification ascendante hiérarchique. Les résultats sont présentés sous forme d'un arbre phylogénétique ou dendrogramme représentant la ressemblance dans la composition protéique.

Les regroupements effectués à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemblent des liens de parenté entre les individus étudiés. Dans un tel arbre, un nœud représente l'ancêtre commun de ses descendants. Le nombre de nœuds entre deux branches indique alors le degré de parenté entre les patients portées par ces branches : plus il y a de nœuds entre deux patients, plus l'ancêtre commun à ces patient est ancien et plus les patients sont éloignés. Cette représentation matérialise bien le fait que les classes formées au cours du processus de classification constituent une hiérarchie indiquée de classe partiellement emboîtées les unes dans les autres.

III.5. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation démontre de nombreux groupes permettant d'estimer les ressemblances dans la composition protéiques des échantillons (figure 09).

A la distance d'agrégation 1.42, ce dendrogramme a été créé avec une subdivision finale de trois groupes. Les deux premiers groupes sont composés chacun d'un seul échantillon 13 et 11. Le troisième est subdivisé en plusieurs sous-groupes 12, 14-10, 9, 8, 6, 7-5, 3, 4, 2, et T-1 à la distance 1.

L'état physiologique et pathologique des patients et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires (figure 09) ne sont pas corrélés malgré les différences qui existent entre les patients recrutés entre eux d'une part et les différences qui existent entre les patients et le témoin d'autre part. C'est-à-dire la classification des patients en fonction des profils protéiques n'a pas suivi l'état pathologique et physiologique des patients. A titre d'exemple : les deux patients 8 et 9 appartiennent au même groupe et forme un clade malgré la divergence qui existe entre eux, en effet le patient 8 est un garçon âgé de 6 ans diagnostiquer depuis la naissance, tandis que la patiente 9 est une fille âgé de 18 mois diagnostiquer depuis la naissance.

Nous devons signaler trois cas particuliers qui présentent des profils entièrement similaires : Le premier cas est celui des patients 10 et 14, avec une différence d'âge (5 ans et 16 mois

respectivement), et aussi de pathologies associées. Les critères qui leurs réunissent sont le sexe et l'atopie familiale.

Concernant le deuxième cas des patients 7 et 5, âgé de 4 et 5 ans respectivement, avec une différence au niveau des pathologies associées. Les critères identiques sont le sexe masculin et l'âge de diagnostic.

Pour le dernier cas le patient 1 âgé de 3 ans qui est diagnostiqué depuis la naissance sachant qu'il n'a aucun antécédent familial ni pathologie associée, l'expression protéique de ce patient est identique à celle de témoin, et son physiologie ne présente aucun symptôme de l'allergie.

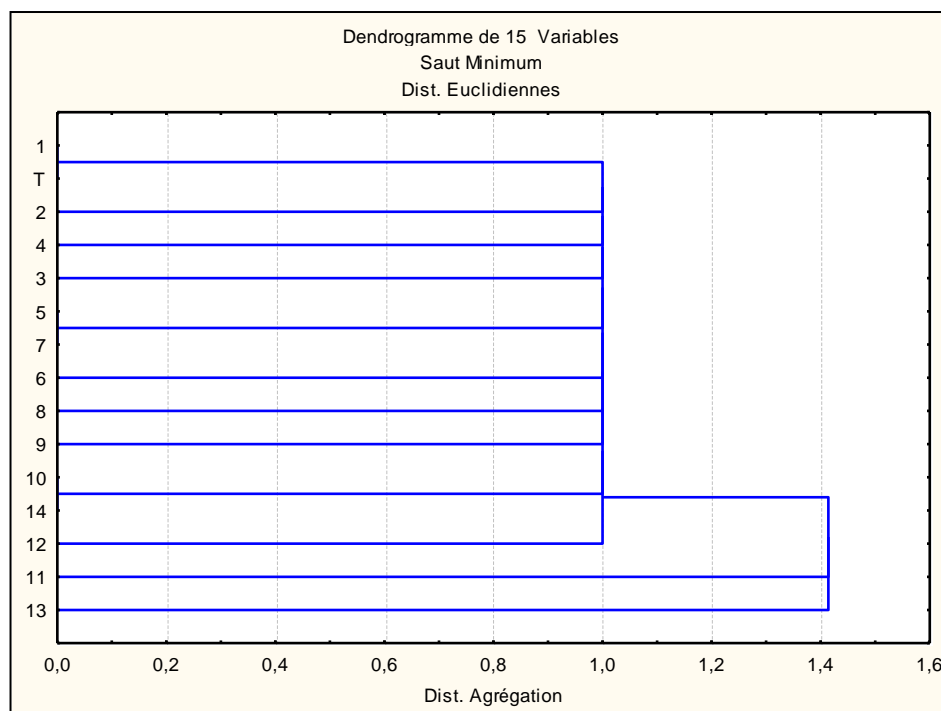


Figure 09 : Dendrogramme des 15 échantillons en condition dénaturante et réductrice

4. Indice de similarité des diagrammes protéiques :

L'IRS (indice de similarité) 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 ($IRS = IAS/N \times 100$)

Tableau 10 : Indices de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	T	
100	83	50	67	83	71	83	57	63	71	75	71	50	71	100	1
	100	60	80	67	57	67	67	50	83	63	83	40	83	83	2
		100	75	60	50	60	60	43	50	38	50	33	50	50	3
			100	50	43	50	80	43	67	50	67	30	67	67	4
				100	83	100	43	71	57	63	57	56	57	83	5
					100	83	38	86	50	56	50	67	50	71	6
						100	43	71	57	63	57	56	57	83	7
							100	33	43	50	83	40	57	57	8
								100	44	67	44	78	44	63	9
									100	56	71	36	100	71	10
										100	75	70	56	75	11
											100	50	71	71	12
												100	36	50	13
													100	71	14
														100	T

Les indices de similarité ont été calculés pour les 15 échantillons, Les valeurs de l'IRS sont rassemblées dans le tableau 10, ces valeurs sont trouvées après comparaison deux à deux des diagrammes protéiques.

Des fortes valeurs d'IRS indiquent que les profils sont similaires et inversement, des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances.

D'après le tableau ci-dessus, nous observons des valeurs d'IRS moyenne qui varient entre les différents patients dans l'intervalle de 33% et 50%. A titre d'exemple :

- IRS à 33% entre les patients : 3 et 13, 8 et 9
- IRS à 43% entre les patients : 3 et 9, 4 et 9, 5 et 8, 8 et 10, 4 et 6

Donc il existe une faible similarité dans la composition protéique de ces patients, avec de dissemblances que des ressemblances.

Nous constatons ensuite des fortes valeurs d'IRS entre 50% et 86%. A titre d'exemple :

- IRS à 50% entre les patients : 1 et 3, 4 et 11, 6 et 12, T et 13
- IRS à 75% entre les patients : 1 et 11, 3 et 4, 11 et T, 11 et 12
- IRS à 80% entre les patients : 2 et 4, 4 et 8

Ainsi, les diagrammes de ces différents patients présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique.

Enfin, des valeurs maximales d'IRS égales à 100 % sont observées entre les patients T et 1, 5 et 7, 10 et 14. Ce qui signifie que ces différents patients présentent des diagrammes identiques avec la même composition protéique.

Conclusion

Conclusion

Ce travail réalisé a porté sur l'exploration du protéome salivaire des patients atteints de l'allergie aux protéines du lait de vache par application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE), et de rechercher des biomarqueurs de cette maladie.

La méthode de Laemeli (1970) modifiée par Singh (1991) a été choisie pour l'obtention d'une meilleure expression des protéines et des profils électrophorétiques reproductibles, par la suite une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH alcalin (pH=8,8) dans des conditions dénaturantes et réductrices a été réalisée.

L'analyse des différents profils électrophorétiques nous a permis de :

- Apprécier la diversité des protéines salivaires.
- Constater que chacun des échantillons présente un profil protéique qui lui est propre par une présence ou absence d'une ou plusieurs bandes protéiques.
- Comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec celui du témoin.
- Révéler les mobilités de chacune des bandes protéiques de haut et faible poids moléculaire.
- Déterminer les différences dans la composition protéique salivaire des patients malades et du témoin.
- Identifier quelques protéines susceptibles d'être des biomarqueurs salivaires de la maladie (IgG et albumine).

D'autre part, l'analyse statistique effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité et également une classification hiérarchique permet d'apprécier numériquement la diversité des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices.

L'analyse du gel nous a permis de détecter 11 bandes protéiques de mobilité différentes.

La comparaison entre les profils électrophorétiques a démontré un exemple de protéines salivaires exprimées que chez les patients atteints de la maladie et absentes chez le témoin (B1, B6, B7, B8 et B9), un autre exemple de protéines salivaires qui sont présentes chez le témoin et les patients malades (B2, B3, B4, B5, B10, et B11). Ces protéines présentent des variations d'expression quantitatives avec des intensités égales ou différentes par rapport à celles du témoin. Certaines protéines sont surexprimées et d'autre sont à l'état de trace.

En perspectives, pour améliorer l'étude sur les protéines salivaires nous envisageons l'utilisation des techniques avec une meilleure résolution telle que l'électrophorèse bidimensionnelle, puis l'identification des protéines d'intérêt par spectrométrie de masse.

***Références
Bibliographiques***

[1]. Aissa, K., Ben Ameer, S., Kamoun, F., Feki, S., Kmiha, S., Aloulou, H., Masmoudi, H., Chabchoub, L. et Hachicha, M. (2017). Allergie aux protéines du lait de vache : histoire naturelle et facteurs de persistance. *Revue Française d'Allergologie*, 57,18-23.

<https://doi.org/10.1016/j.reval.2016.09.009>

[2]. Anon. 2019. "Lait de vache, signes, rapport OMS | Allergienet.com." Allergienet.com. Disponible sur : <https://www.allergienet.com/lait-de-vache-allergie-aplv-signes-rapport-oms/?fbclid=IwAR3O-p6Xtw2YVhWMFW6ynh9iD77FjVfyY-lnnCm3ofbJ6lboopgUdADijvA> [Consulté le 25 mai 2019].

[3]. Aps, JKM. et Martens, LC. (2005). The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International*, 150, 119-131.

<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.026>

[4]. Benharrats, K., Kaddour Ahmed, I. et Kadri, I. (2017). Etude des modifications de certains paramètres cliniques et salivaires chez les patients obèses au C.H.U Tlemcen. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Docteur en Médecine Dentaire. Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

[5]. Bidat, E., Deschildre, A., Lemoine, A., Benoist, G., Valleteau de Moulliac, J., Tressole, C., Garcette, K., Juchet, A., Michaud, E., Languépin, J., Lamireau, T., Lachaux, A. et Tounian, P. (2019). Allergie aux protéines du lait de vache : guide pratique de la réintroduction des protéines du lait de vache : quand, comment réintroduire. *Revue Française d'Allergologie*, 59, 41-53.

<https://doi.org/10.1016/j.reval.2018.11.006>

[6]. Bostick, WD., Denton, MS. et Dinsmore, SR. Bioluminescence methods for enzymatic determinations. US patent document 4,357,420/A/. Bibliographic information available from INIS: http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:14775760

[7]. Boughellout, H., Benatallah, M. et Zidoune N. (2015). Prévalence de l'allergie aux protéines du lait de vache chez des enfants âgés de moins de 3 ans de la ville de Constantine (Algérie). *Revue Française d'Allergologie*, 55,288-292.

<https://doi.org/10.1016/j.reval.2015.02.182>

[8]. Bursztejn, A. (2013). Évaluation du terrain génétique des hypersensibilités. Thèse. Université de Lorraine, France.

[9].Cagney, DN., Sul, J., Huang, RY., Ligon, KL., Wen, PY. et Alexander, BM. (2018). The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. *Neuro-Oncology*, 20, 1162–1172.

<https://academic.oup.com/neuro-oncology/advance-article-abstract/doi/10.1093/neuonc/nox242/4774039>

[10].Castel, C. (2016). Les Thérapeutiques du Syndrome de Gougerot-Sjögren. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Chirurgie Dentaire. Université du Droit et de la Santé de Lille 2, Lille.

[11].Chiarizia, N. (2017). Brevetabilité des biomarqueurs : étude comparée de la situation en Europe et aux Etats-Unis. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de Lorraine, Nancy.

[12].Da Silva, PHF., Oliveira, VCD. et Perin LM. (2019). Chapter 14 - Cow's Milk Protein Allergy and Lactose Intolerance. In *Raw Milk Balance between Hazards and Benefits*, 295-309, Academic Press, London. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00014-6>

[13].Davy, CME. (2016). Hyposialie et Xérostomie : le point sur les étiologies, les conséquences bucco-dentaires et la prise en charge. Rôle du pharmacien d'officine. . Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de Nantes, Nantes.

[14].Dawes, C. (2008). Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *Journal of the American Dental Association*, 139, 18-24.

<https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0351>

[15].De Almeida, PDV., Grégio, AM., Machado, MA., De Lima, AA. et Azevedo, LR. (2008). Saliva composition and functions: A comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 9, 72-80.

https://www.researchgate.net/publication/5517423_Saliva_composition_and_functions_A_comprehensive_review

[16].Devoize, L. et Dallel R. (2010). Salivation. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)-Médecine buccale, 1-18. [Article 28-080-B-10].

https://www.researchgate.net/publication/230752238_Salivation

[17].Dodds, MWJ., Johnson, D A. et Yeh, C-K. (2005). Health benefits of saliva: a review. *Journal of Dentistry*, 33, 223-233.

<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.009>

[18].Dupont, C. et Soulaines, P. (2017). Actualités thérapeutiques dans la prise en charge nutritionnelle de l'allergie aux protéines de lait de vache. *Archives de Pédiatrie*, 24, 1350-1357.

<https://doi.org/10.1016/j.arcped.2017.09.008>

[19].Eftekhari, A., Hasanzadeh, M., Sharifi, S., Dizaj, SM., Khalilov, R. et Ahmadian, E. (2019). Bioassay of saliva proteins: The best alternative for conventional methods in non-invasive diagnosis of cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 1246-1255. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.277>

[20].Frank, R., et Hargreaves, R. (2003). Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 566–580.

<https://doi.org/10.1038/nrd1130>

[21].Folia, M. (2012). Xéno-hormones et homéostasie buccale : Impact sur les préférences gustatives et les glandes salivaires. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de la Vie. Université de Bourgogne, Dijon.

[22].Garnier, L. et Bienvenu, F. (2017). Tests biologiques diagnostiques dans l'allergie au lait de vache. *Revue Française d'allergologie*, 57,494-498.

<https://doi.org/10.1016/j.reval.2017.08.007>

[23].Guénard-Bilbault, L. et Moneret-Vautrin, D-A. (2003). Allergie aux protéines du lait de vache chez l'enfant. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 16, 36-43.

[https://doi.org/10.1016/S0987-7983\(03\)90052-1](https://doi.org/10.1016/S0987-7983(03)90052-1)

[24].Gug, IT., Tertis, M., Hosu, O. et Cristea, C. (2019). Salivary biomarkers detection: Analytical and immunological methods overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 301-316. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.020>

[25].Hemadi, AS., Huang, R., Zhou, Y., et Zou, J. (2017). Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *International Journal of Oral Science*, 9, e1. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fijos.2017.35>

[26].Hirtz, C., Chevalier, F., Raingeard, I., Christophe, J., Bringer, J., Rossignol, M. et Deville De Périère, D. (2005). Recherche préliminaire de marqueurs salivaires du diabète de type 1 chez l'homme. *Les cahiers de l'ADF*, N°18-19-1^{er} trimestre.

[27]. Jianjian, H., Changjun, L., Yanbo, W., Chong, W., Menghua, X., Yi, Q. et Linglin, F. (2018). Application of in vitro and in vivo models in the study of food allergy. *Food Science and Human Wellness*, 7, 235-243.

<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.10.002>

[28].Huq, NL., Cross, KJ., Ung, M., Myroforidis, H., Veith, PD., Chen, D., Stanton, D., He, H., Ward, BR. et Reynolds, EC. (2007). A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 13, 547-564. <https://doi.org/10.1007/s10989-007-9109-9>

[29].Kaczor-Urbanowicz, K E., Martin Carreras-Presas, C., Aro, K., Tu, M., Garcia-Godoy, F. et Wong, DT. (2017). Saliva diagnostics - Current views and directions. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 242, 459–472.

<https://dx.doi.org/10.1177%2F1535370216681550>

[30].Laemlli, UK. (1970). Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

[31].Lynge Pedersen, AM. et Belstrøm, D. (2019). The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry*, 80, 3-12.

<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.010>

[32].Mayeux, R. (2004). Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1, 182–188. <https://dx.doi.org/10.1602%2Fneurorx.1.2.182>

[33].Molckhou, P. (2016). Les hypersensibilités digestives aux aliments non IgE médiées. *Revue française d'allergologie*, 56, 76-83.

<https://doi.org/10.1016/j.reval.2015.10.010>

- [34].NCI Dictionary of Cancer Terms, ” *National Cancer Institute*. [Online]. Disponible sur : <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>. [Consulté le : 05 Février 2017].
- [35].Novelli, G., Ciccacci, C., Borgiani, P., Papaluca Amati, M., et Abadie, E. (2008). Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clinical cases in mineral and bone metabolism: the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 5, 149–154. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2781197/>
- [36].Nikitkova, A E., Haase, EM. et Scannapieco, FA. (2013). Taking the Starch out of Oral Biofilm Formation: Molecular Basis and Functional Significance of Salivary α -Amylase Binding to Oral Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 416–423. <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.02581-12>
- [37].Ombeline, M. (2013). Facteurs favorisant l’émergence des allergies : des gènes à la théorie hygiéniste .Thèse. Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse.
- [38].Paone, JF., Waalkes, TP., Baker, RR. et Shaper, JH. (1980). Serum UDP-galactosyl transferase as a potential biomarker for breast carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 15, 59-66. <https://doi.org/10.1002/jso.2930150110>
- [39].Petit, G. (2015). Immunothérapie orale chez l’enfant allergique aux protéines de lait de vache IgE médiée : Expérience toulousaine. Thèse. UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER. Toulouse.
- [40].Phizicky, E., Bastiaens, PIH., Zhu, H., Snyder, M. et Fields, S. (2003).Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, 422, 208–215. <https://doi.org/10.1038/nature01512>
- [41].Rancé, F., Abbal, M. et Didier, A. (2002). Allergies et hypersensibilités chez l’enfant et chez l’adulte : aspects épidémiologiques, diagnostiques et principes de traitement. *Revue Française d’allergologie et d’immunologie clinique*, 42,378-401. [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(02\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(02)00167-3)
- [42].Rancé, F. et Dutau, G. (2009). Actualités sur l’exploration et la prise en charge de l’allergie aux protéines du lait de vache (APLV). *Revue française d’allergologie*, 49, 28-33. [https://doi.org/10.1016/S1877-0320\(09\)72481-9](https://doi.org/10.1016/S1877-0320(09)72481-9)

- [43].Roblegg, E., Coughran, A. et Sirjani, D. (2019). Saliva: An all-rounder of our body. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic*, 142, 133-141.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.016>
- [44].Romanetto, J. (2011). Intérêt des marqueurs biologiques dans les essais cliniques. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincare-Nancy1, Nancy.
- [45].Sánchez, J. et Sánchez, A. (2019). Epidemiologic studies about food allergy and food sensitization in tropical countries. Results and limitations. *Allergologia et Immunopathologia*, In Press, Corrected Proof.
<https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.11.001>
- [46].Schlienger, J. (2017).Chapitre 38 : Allergie alimentaire. In *Diététique en pratique médicale courante*, 337-345. Elsevier Health Sciences, France.
<https://doi.org/10.1016/B978-2-294-75384-8.00038-7>
- [47].Singh, NK., Shepherd, KW. et Cornish, GB. (1991). A simplified SDS—PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin.*Journal of Cereal Science*, 14, 203-208.
[https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(09\)80039-8](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80039-8)
- [48].Soulaines, P. et Dupont, C. (2018). Le régime alimentaire de l'enfant souffrant d'allergie aux protéines du lait de vache. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 53, 332-340.
<https://doi.org/10.1016/j.cnd.2018.09.005>
- [49].Tiwari, M. (2011). Science behind human saliva. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 2, 53–58.
<https://dx.doi.org/10.4103%2F0976-9668.82322>
- [50].Treboss Rouch, E. (2015). Amélioration de l'Hygiène Buccodentaire par le Conseil en Officine. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse.

[51].Trigui, Y. (2018). Biomarqueurs de la salive et santé générale. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Chirurgie Dentaire. Université de Lorraine, Nancy.

[52].Turck, D. (2017). Chapitre 21 - Possibilités substitutives actuelles dans l'allergie au lait de vache. In Allergies Alimentaires Nouveaux Concepts, Affections Actuelles, Perspectives Thérapeutiques, 215-225, Elsevier Masson, France.

<https://doi.org/10.1016/B978-2-294-74931-5.00021-9>

[53].Vilain, A-C. (2010).Qu'est-ce que le lait. Revue française d'allergologie, 50,124-127

<https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.01.032>

[54].Viola, S. (2014).Traitement diététique de l'allergie aux protéines de lait de vache. Journal de pédiatrie et de puériculture, 27, 122-126.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpp.2014.03.006>

[55].Zhang, Y., Sun, J., Lin, C-C., Abemayor, E., Wang, MB. et Wong, DTW. (2016). The emerging landscape of salivary diagnostics. Periodontology 2000, 70, 38–52.

Annexe 1

Questionnaires

Nom :

Prénom :

Sexe :

Age :

Région :

Age de début de la maladie

.....

Maladies associées

.....

Antécédents familiaux

Oui

Non

Le lait de régime

.....

Annexe 2

Liste des patients (nom et prénom, sexe, âge, antécédent familial, maladies associées, début de la maladie et wilaya)

Nom et prénom	Sexe	Age	Antécédents familiaux	Maladies associées	Début de la maladie	Wilaya
1/Lijisi Sofiane	G	3 ans	Non	Non	Depuis la naissance	Constantine
2/Guersal Siradj Eddine	G	5 ans	Non	Asthme	Depuis 3 mois	Constantine
3/Djeniba Younes	G	3 ans	Non	Non	Depuis 6 mois	Constantine
4/Aliouat Assil	F	5 ans	Non	Asthme Anémie	Depuis 5 mois	Constantine
5/Nemdili Nazim	G	5 ans	Non	Non	Depuis la naissance	Constantine
6/Lebiad Nazim	G	2 ans	Non	Allergie au blanc d'œuf	Depuis la naissance	Skikda
7/Atrousse Akram	G	4 ans	Non	Asthme	Depuis la naissance	Constantine
8/Adjas Kaissar	G	6 ans	Non	Non	Depuis la naissance	Constantine
9/Benkhalaf Rahil	F	1 an et 6 mois	Oui	Non	Depuis la naissance	Constantine
10/Kehal Malek	F	5 ans	Oui	Non	Depuis la naissance	Constantine
11/Khoudja Aya	F	8 ans	Non	Non	Depuis 1 mois	Constantine
12/Habib Rakane Diaa Eddine	G	1 an et 4 mois	non	Asthme	Depuis 9 mois	Constantine
13/Remdani Ghassan	G	1 an et 3 mois	Non	Non	Depuis 2 mois	Constantine
14/Kaimi Dounia	F	1 an et 4 mois	Oui	Asthme Allergie aux arachides	Depuis 5 mois	Oum el bouaghi
T/Merouani Daiaa Madjid	G	5 ans				Constantine

Annexe 3

Composition des gels d'électrophorèse

Gel de séparation : T : 12,52% C : 0,97%

- Acrylamide 40% 12,4ml
- Bis acrylamide 2% 2,4 ml
- Eau permutée 8,6 ml
- Tampon Tris-HCL pH 8,8 15,2ml
- SDS 10% 0,40 ml
- APS 1% 1 ml
- TEMED 0,020 ml

Gel de concentration : T : 2,88% C : 1,42%

- Acrylamide 40% 1ml
- Bis acrylamide 2% 0,3 ml
- Eau permutée 10,2 ml
- Tampon Tris-HCL pH 8,8 1,7 ml
- SDS 10% 0,14 ml
- APS 1% 0,70 ml
- TEMED 0,014 ml

الملخص

يعتبر ارتفاع معدل انتشار الحساسية الناتجة عن بروتينات حليب البقر واحدة من اهم الظواهر الصحية التي أخذت حيزا ملفتا في البحث العلمي، ومن أجل فتح آفاق جديدة حول طرق تشخيص الأمراض، تم اعتبار اللعاب كمادة حيوية تحتوي على العديد من المكونات التي لها دور بارز في هذا المجال إذ يحتوي على العديد من المؤشرات الحيوية التي تساهم من خلالها رصدها ودراستها في تشخيص الأمراض بشكل مبكر، فضلا عن مزاياه الاقتصادية كسهولة التجميع والحفظ والنقل والمعاينة.

تتناول هذه الدراسة إمكانية استخدام اللعاب كوسيلة للكشف المبكر عن وجود حساسية تجاه بروتين حليب البقر من خلال رصد المؤشرات الحيوية الموجودة فيه، حيث أجريت دراسة سريرية كمية بأثر رجعي شملت مصلحة طب الأطفال بالمركز الاستشفائي الجامعي قسنطينة والمؤسسة الاستشفائية المتخصصة لرعاية الطفولة والأمومة المنصورة- قسنطينة -خلال الفترة الممتدة من فيفري إلى ماي 2019.

تم أخذ عينات من لعاب 14 طفلا من كلا الجنسين تتراوح أعمارهم ما بين السنة والثمان (8) سنوات، ثم فصل مكوناتها في شروط غير طبيعية ومرجعة بحثا عن المؤشرات الحيوية الدالة على وجود حساسية تجاه بروتين حليب البقر، ثم تمت مقارنة النتائج مع نتائج دراسات مشابهة تم اجراءها على لعاب شخص غير مصاب بهذا المرض.

مكن التحليل الهلامي من تحديد 11 شريط بروتيني مختلف من حيث الحركية في هلام الفصل الكهربائي و كذلك ومن حيث تواجد الكمي والكيفي في اللعاب. اضافة الى تحويل هذه النتائج إلى أرقام لتسهيل التحليل و الاستنتاج . كما تم اجراء دراسة إحصائية من خلال وضع مخطط قياسي وتصنيف هرمي، إضافة إلى حساب الترددات ومؤشر تشابه الأفراد وفقاً لتكوين البروتينات اللعابية.

لقد تمكنا من خلال هذه الدراسة من إثبات إمكانية استخدام اللعاب في الكشف عن وجود حساسية تجاه بروتينات حليب البقر، وعليه فإنه من المقترح استخدامه في التشخيص المبكر للأمراض.

الكلمات المفتاحية: اللعاب، البروتينات، المؤشرات الحيوية اللعابية، حساسية تجاه بروتينات حليب البقر، الهجرة الكهربائية، تشخيص.

Abstract:

Due to the increasing incidence and prevalence of cow's milk protein allergies, which are gaining increasing attention, health problems have opened new perspectives for diagnostic methods. Saliva is being considered a promising biomaterial, it is already used for the diagnosis of other pathologies. Saliva as a multi-component oral fluid includes various disease signaling biomarkers and has a great potential for early diagnosis of diseases with easy and economical collection, storage, transportation and treatment. Therefore, the detection of biomarkers and proteins in saliva samples is very demanding. This thesis aimed to verify the possible use of saliva for the detection of biomarkers in the diagnosis of cow's milk protein allergy. This is a retrospective clinical study, developed in the pediatric ward of the CHU Constantine and the pediatric department of EHS mother-child El Mensora Constantine, from February to May 2019. The samples consisted of 14 children of both sexes, aged 1 to 8 years. Patient saliva samples were collected and subsequently separated by the SDS-PAGE one-dimensional electrophoresis technique under denaturing and reducing conditions for the detection of potential salivary biomarkers of APLV. We compared the electrophoretic profiles of the salivary proteins of healthy subjects and sick patients.

The analysis of the gels made it possible to count 11 protein bands of different mobilities, presenting quantitative and qualitative variations of expression in the salivary medium. In order to numerically appreciate the diversity of these salivary proteins, a statistical study was carried out by establishing a standard diagram, a hierarchical classification, also by calculating the frequencies and the index of similarity of the individuals according to the composition of the salivary proteins.

The use of the salivary technique for the diagnosis of cow's milk protein allergy is therefore suggested. Salivary proteins can be considered as potential biomarkers of the pathology studied.

Key words: saliva, proteins, salivary biomarkers, cow's milk protein allergy, electrophoresis, non-invasive diagnosis.

<p>HAMAMA NOUR EL IMENE</p> <p>CHENNI RANIA</p>	<p>Date de soutenance : 18/07/2019</p>
<p>Mémoire pour l'obtention du diplôme de master en biochimie</p> <p>Option : Biochimie de la nutrition</p>	
<p>Thème : Exploration du protéome salivaire des enfants atteints d'allergie aux protéines du lait de vache par application de la technique d'électrophorèse SDS-PAGE.</p>	
<p>Résumé :</p> <p>En raison de l'incidence et de la prévalence croissante des allergies aux protéines du lait de vache qui attire de plus en plus l'attention, les problèmes de santé ont ouvert de nouvelles perspectives pour les méthodes de diagnostic. La salive étant considérée comme un biomatériau prometteur, est déjà utilisé pour le diagnostic des autres pathologies. La salive en tant que liquide buccal à constituants multiples comprend divers biomarqueurs de signalisation de la maladie et présente un grand potentiel pour le diagnostic précoce des maladies avec une collecte, un stockage, un transport et un traitement économique et facile. Par conséquent, la détection de biomarqueurs et de protéines dans les échantillons de salive est très exigeante. Ce mémoire visait à vérifier l'utilisation possible de la salive pour la détection des biomarqueurs dans le diagnostic des allergies aux protéines du lait de vache. Il s'agit d'une étude clinique rétrospective, développée dans le service de pédiatrie du CHU de Constantine et le service de pédiatrie d'EHS mère enfant El Mensora Constantine, de février à mai 2019. Les échantillons étaient composés de 14 enfants des deux sexes, âgés de 1 à 8 ans. Des échantillons de salive des patients ont été prélevés et soumis par la suite à une séparation par la technique d'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices pour la détection de biomarqueurs salivaires potentiels de l'APLV. Nous avons comparé les profils électrophorétiques des protéines salivaires du sujet sain et des patients malades.</p> <p>L'analyse des gels a permis de dénombrer 11 bandes protéiques de mobilités différentes, présentant des variations quantitatives et qualitatives d'expression dans le milieu salivaire. Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires, une étude statistique a été effectuée en établissant un diagramme type, une classification hiérarchique, également en calculant les fréquences et l'indice de similarité des individus selon la composition des protéines salivaires.</p> <p>L'utilisation de la technique salivaire pour le diagnostic de l'allergie aux protéines du lait de vache est donc suggérée. Des protéines salivaires peuvent être considérées comme des biomarqueurs potentiels de la pathologie étudiée.</p>	
<p>Laboratoire de Génétique biochimie et Biotechnologie Végétales, Département de Biochimie Moléculaire et Cellulaire, Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie Université des frères Mentouri Constantine 1</p>	
<p>Mots clés : salive, protéines, biomarqueurs salivaires, allergie aux protéines du lait de vache, électrophorèse, diagnostic.</p>	
<p>Jury d'évaluation :</p> <p>Président de jury : prof. Khelifi. Douadi (UFMC1)</p> <p>Encadrante : Dr. Bellil. Inès (ATRBSA)</p> <p>Examinatrice: Dr. Bechekri. Sakina (UFMC1)</p>	