

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie
Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم: البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Thème

Biomarqueurs de la salive et santé générale

Membres de Jury

Présidente : Dr/ BOUHAFS L.

Examinatrice : Dr/ BOUTENNOUN H.

Encadrante : Dr/ MEDOURI A.

Présenté par

ABDELLEH Amina

ALIOUA Farida

BRIMA Bessma

Année Universitaire : 2019-2020

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Dédicace

Je dédie ce travail de fin d'études à:

La première femme dans ma vie ma mère, à celle qui me soutient et qui m'encourage d'aller vers l'avant, tous les mots de monde ne sauraient exprimer l'amour dans mon cœur.

A mon cher père Abdelhak, puisse Allah, vous préserve et vous accorde santé, longue vie et bonheur.

A mon mari Rachid; je vous remercie pour tous le soutien et l'amour que vous me portez depuis ta connaissance.

A mon fils Sadjid

A ma seule soeur Rania qui me partage la vie et m'aide à continuer.

A mes frères: Ishak, Ahmed, Yahia, et Yaakoub.

A ma grande mère Fatiha, je vous remercie pour l'amour que vous me portez depuis mon enfance

A toutes mes amies: Meryem, Farida, Kenza, Bessma, Khadîdja, et Nour el Houda

A toutes mes cousins: Hayat, Assia, Malek et Walid ربي يرحمك

A mon encadrante Dr. MEDOURI Asma, je tiens à exprimer mes remerciements, vos conseils et vos remarques nous ont aidés dans notre travail. Merci pour votre patience.

A mes camarades Bessma et Farida et tous ceux qui me sont chers.

A toute personne qui a participé à la réalisation de ce mémoire.

Amina

Dédicace

Je dédie ce travail de fin d'études

A ma très chère mère, Saida, que je ne cesse de remercier pour tout ce qu'elle m'a donné. Elle a fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Que Allah la récompense pour tous ses bienfaits.

Spécialement à mon père Mahmoud à qui je dois énormément, qui a cru en moi et qui m'a donné les moyens d'aller aussi loin.

A mes frères: Younass, Walid, et Abd-Elmadjid.

*A mes sœurs: Imen, Alima, Nabila et son marie Dr. Boudjemaa
Abdelkader et Zahira.*

A mes amies: Ferial, Imen , Soumia, Halima, Souad et Sana.

A tous les étudiantes de Master II biochimie 2020

*Et particulièrement à mes chères camarades " **Bessma et Amina** "
qui m'ont accompagnées durant la réalisation de ce mémoire.*

*Enfin, je dédie ce mémoire à ceux qui m'aiment et surtout ceux que
j'aime.*

Farida

Dédicace

C'est tout simplement que je dédie ce modeste travail de fin d'études à:

*A la mémoire de **mes très chers papa Youssef et Salah** disparu trop tôt ; j'aurais aimé vous voir mes très chers côtés et t'entendre me dire BRAVO ma fille. J'espère qu'ils apprécient cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Allah, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

*A mes tendres grandes-mères **Cherifa et Messaouda** ربي يرحمها: Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que Allah, le très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie.*

A mes très chers parents Messaoud et Noura

Tous les mots de monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Allah, le tout puissant, vous préserver et vous accorde santé, longue vie et bonheur

*A mon encadrante **Dr. MEDOURI Asma**: vos remarques pertinentes et vos conseils précieux nous ont beaucoup aidés à améliorer la qualité de ce travail. Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils*

A mes très chères oncles et tantes: Djamila, Saliha, Tunès, Assia, Nassira, Fozia, Fateh, Ferhet

*A mes chers frères et sœurs: Mohamed, Amine, Isslem, Youssra
pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité*

A mes chères cousines: Amel, Donya, Wissam, Nedjet

A toutes mes amies: Linda, Halima, Yasmine, Bouchra, Sara, Samah, Nessrine

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études. A mes camarades : Farida et Amina et tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer. Merci d'avoir cru en moi Enfin merci à ceux et celles qui nous ont aidés d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur. Merci à vous tous

Bessma

Remerciements

Tout d'abord nos remerciements vont à Allah le tout puissant.
Nous adressons nos vifs remerciements à Dr.MEDOURI d'avoir nous fait l'honneur d'être l'encadrante de ce travail, ainsi que pour son soutien et ses conseils.

Nous remercions également Dr.BOUHAFFS et Dr. BOUTENNOUN d'avoir accepté d'évaluer notre travail.
Nos remerciements vont aussi à nos familles pour leur soutien et encouragement, ainsi qu'à nos collègues de la promotion de Biochimie 2020.

Enfin nous adressons nos remerciements à tous nos enseignants du Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Jijel, et à tous les personnes qui ont contribué dans l'accomplissement de ce travail.

Merci.

Liste des abréviations

CMH	:	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CPA	:	Cellule présentatrice d'antigène
DGP	:	Peptide déamidé de gliadine
HLA	:	Antigène leucocytaire humain
IL	:	Interleukine
IFI	:	Immunofluorescence indirecte
LB	:	Lymphocyte B
LT	:	Lymphocyte T
LTreg	:	Les lymphocytes T régulateurs
MC	:	Maladie cœliaque
MICA	:	Molécule Intercellulaire d’Adhésion
NkG2D	:	Récepteur activateur des cellules « Natural-Killer »
RSG	:	Régime sans gluten
SG-FPM	:	Sous unités de gluténines de faible poids moléculaire
SG-HPM	:	Sous unité de gluténines de haut poids moléculaire
TG	:	Transglutaminases
TGF	:	Transforming Growth Factor
TGt	:	Transglutaminase tissulaire
Th	:	lymphocytes T helper
TNF-	:	Le facteur de nécrose tumorale
PT	:	Pepsine /Trypsine
OSCC	:	Le carcinome épidermoïde de la cavité buccale
OPMD	:	troubles buccaux potentiellement malins
RETN	:	La résistine
LH	:	l'hormone lutéinisante
TCA	:	Acide-acétone trichloroacétique
iTRAQ	:	Etiquette isobare pour la quantification relative et absolue
SOD2	:	Dismutase de superoxyde 2
HP	:	Haptoglobine
ROC	:	Caractéristique de fonctionnement du récepteur
HNSCC	:	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou
MRP14	:	Protéine de liaison au calcium S100

Liste des figures et des tableaux

Figure 1	: Formation de la salive	07
Figure 2	: Anatomie des glandes salivaires	09
Figure 3	: Structure histologique des différents types d'acini et canaux glandulaires	10
Figure 4	: La salive est composée de l'écules et fluides de différents sources	13
Figure 5	: Schéma présentant les paramètres de recherche et les résultats de sélection	16
Figure 6	: Identification protéomique de l'isoforme kalllicréine Klk1 dans la salive à partir du modèle murin mdx-4cv de la dystrophie musculaire de Duchenne	18
Figure 7	: Résumé graphique décrivant l'analyse protéomique et bioinformatiques des échantillons salivaires	19
Figure 8	: (A) La classification fonctionnelle des protéines a révélé que les enzymes et les cytokines étaient les principaux groupes fonctionnels du protéome salivaire. (B) L'analyse en cluster indique que le profil protéomique total est capable de distinguer les sujets diabétiques des sujets à bon indice glycémique et sujets en bonne santé	20
Figure 9	: Le réseau d'interaction protéines-protéines déterminé par STRING sur les protéines exprimées différemment	22
Figure 10	: Évaluation et validation des biomarqueurs salivaires	22
Figure 11	: Profil électrophorétique des protéines salivaires analysées par 2D DIGE (pHi 3–11). Les 6 protéines indiquées présentent des différences d'expression significatives entre les échantillons étudiés	24
Figure 12	: (A) Pic de base du chromatogramme (ms) géré par LC-MS-MS de digestats de la protéine de liaison au calcium S100. (B) Ion continu de séries b ou y- d'au moins six résidus du peptide KDLQNFLK de la S100 calcium binding protein.	25
Figure 13	: Western blot et analyse statistique de la salive des échantillons de contrôle et HNSCC en utilisant un anticorps dirigé contre le MRP14	26
Figure 14	: Profilage protéomique des échantillons de salive prélevés les volontaires sains, les personnes de l'OPMD et les patients de l'OSCC	28
Figure 15	: Niveaux salivaires de RETN chez les patients OSCC	29
Figure 16	: Niveaux d'œstradiol salivaire pendant le cycle menstruel	30
Figure 17	: SDS-PAGE des protéines salivaires entières	31
Figure 18	: Analyse Western blot de la protéine salivaire	31
Figure 19	: Activité antimicrobienne de la salive pendant les trois phases du cycle menstruel	32

Tableau 1 : Protéines dont les niveaux d'abondance ont augmenté ou diminué dans la salive HNSCC par rapport au groupe témoin	23
Tableau 2 : Concentrations de protéines salivaires au cours des différentes phases du cycle menstruel	30

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Liste des abréviations

Listes des figures et tableaux

Sommaire

Introduction.....01

Revue bibliographique

Chapitre I: Salive et glandes salivaires

1. Salive.....	03
1.1. Définition	03
1.2. Composition biochimique de la salive	03
1.3. Caractéristiques physico-chimiques de la salive	05
1.4. Mécanisme de formation	06
1.5. Rôle de la salive	07
2. Les glandes salivaires.....	08
2.1. Anatomie	08
2.2 Les types des glandes salivaires	09
2.2.1. Glandes salivaires majeures	09
2.2.2. Glandes salivaires « mineures »	09
2.3. Histologie des glandes salivaires.....	10

Chapitre II: Les biomarqueurs

1. Les biomarqueurs	11
1.1. Définition.....	11
1.2. Les types de biomarqueurs	11
1.3. Les critères d'un biomarqueur.....	11
1.4. L'intérêt clinique d'un biomarqueur.....	12
1.5. Recherche et validation d'un biomarqueur.....	12
1-6. La salive, source de biomarqueurs	13
1.7. Préparation des échantillons salivaires	13
Méthodologie de l'étude.....	15

Résultats de l'analyse	17
Discussion et synthèse générale.....	33
Conclusion.....	36
Références bibliographiques	37

Introduction

L'intérêt du monde scientifique vis-à-vis de la salive a cru dans les 50 dernières années avec l'avènement de nouvelles techniques d'analyse. 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.....etc.) (**Devoize et Dallell, 2011**). La salive est un liquide incolore, inodore, insipide, opalin, spumeux, un peu filant, très légèrement alcalin. Les rôles de la salive sont nombreux, notons l'importance de l'humidification des muqueuses primordiale à certaines fonctions essentielles pour l'homme comme l'alimentation, l'élocution et la protection des tissus oraux (**Gasperment, 2018**).

Il est désormais que la salive, du fait de la possible modification de sa composition dans des processus physiologiques ou pathologiques, a également un fort potentiel d'analyse pour le diagnostic et le suivi médical (**Nagihan et al. 2020**).

Le terme « biomarqueur » est un néologisme récemment intégré dans le jargon médical. Il est couramment accepté qu'un biomarqueur soit une caractéristique biologique mesurable liée à un processus normal ou non. Ainsi, il est possible d'utiliser des biomarqueurs dans des domaines des sciences très différents. Dans le domaine médical, un biomarqueur peut être utilisé pour le dépistage médical, le diagnostic, la réponse à un traitement médical, la rechute après un traitement ou la toxicité d'une molécule. Le biomarqueur est alors le plus souvent une protéine (**Chenevier-Gobeaux et al. 2010**).

La salive peut être donc considérée comme un milieu privilégié de diagnostic et/ou de suivi de l'évolution de certaines maladies et de leurs complications par la recherche de biomarqueurs salivaires. Ceci permet une approche différente de la physiopathologie et de diagnostic des maladies particulièrement les maladies neurologiques, les maladies cancéreuses, particulièrement les cancers de la cavité buccale, des infections par le virus du SIDA, ainsi que les deux types de diabète (**Kaufman et Lamster, 2002; Hirtz et al. 2005; Rehan et al. 2016**). Ainsi, l'utilisation des fluides salivaires comme moyen de développement et d'évaluation des biomarqueurs allège l'inconfort des sujets/patients en fournissant une méthode non invasive de détection des maladies.

Dans ce contexte, notre objectif vise à évaluer et analyser des études portant sur l'utilisation de la salive comme milieu de recherche de biomarqueurs de différentes pathologies tout en se focalisant sur l'apport de l'approche protéomique.

Dans un premier temps, nous exposerons des généralités sur la salive, les glandes salivaires, les biomarqueurs ainsi que la relation salive/biomarqueurs.

Ensuite nous décrirons dans la partie méthodologie de l'étude les étapes suivies dans l'analyse des articles.

Les résultats de l'analyse des articles retenus seront décrits avant de présenter une discussion et une synthèse générale des résultats de l'analyse.

Revue bibliographique

*Salive et glandes
salivaires*

1. Salive

1.1 Définition

La salive est la première sécrétion digestive, elle désigne un liquide physiologique incolore alcalin, légèrement visqueux sécrété par les glandes salivaires; dites majeures et mineures (**Ganong, 2005**). Ces dernières déversent dans la cavité buccale une salive spéciale. Il existe donc trois espèces de salives: une salive parotidienne, une salive sous-maxillaire et une salive sublinguale. L'ensemble de ces trois salives, mélangé au mucus buccal et aux produits de sécrétion des glandes de la muqueuse buccale, constitue la salive totale ou salive mixte (**Bendrihem et Vacher, 2012**).

1.2 Composition biochimique de la salive

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

a. Eau

L'eau constitue 99 % de la salive dont le rôle est l'humidification du bol, la solubilisation des substances ce qui permet de détecter le goût. Le pH du flux salivaire peut varier de 5,3 (faible débit) à 7,8 (débit de pointe) (**Humphrey et Williamson, 2001; Chattopadhyay et Panda, 2019**).

b. Constituants inorganiques

La salive contient des constituants ioniques dont la composition varie pendant la sécrétion. Certains de ces ions permettent de réguler le pH du milieu buccal et qui ont une action bactériostatique (**Ganong, 2005**). Les constituants inorganiques de la salive sont les ions sodium, potassium, calcium, hydrogène, chlorures, phosphates inorganiques, bicarbonates, des halogènes (iode et fluor) et des métaux (cuivre, fer). 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. Le cuivre, le fer et les fluorures sont à l'état de traces. La concentration de tous ces ions et électrolytes est toutefois sous la dépendance de nombreux facteurs comme le type de glande, le débit salivaire, la durée et la nature de la stimulation ou la rythmicité biologique. Les ions H^+ sont responsables du pH salivaire. 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 thio cyanates, anions nécessaires à l'activité des peroxydases, peuvent ainsi potentialiser l'activité du lysozyme. La présence de calcium et la sursaturation des phosphates inorganiques dans la salive permettent la reminéralisation des cristaux d'hydroxyapatite après attaque acide (**Devoize et Dallel, 2010**).

c. Constituants organiques

L'essentiel des composants organiques de la salive est représenté par des protéines. Plus de 1300 protéines ont été identifiées par diverses approches protéomiques. La nature et le rôle précis de nombre d'entre elles sont encore inconnus. Il y a environ 2,5 grammes de protéines dans 1 litre de salive émise à faible débit. La concentration en protéines augmente en général avec le débit salivaire. Ces protéines sont classées en fonction de leur origine (**Helmerhorst et al. 2007**) en:

- **Protéines salivaires**

- ✓ **Protéines extrinsèques** (issues du sérum): elles sont représentées par des albumines d'origine sérique (5 % à 10 % des protéines totales), des IgA, IgG, IgM ou d'autres protéines du système immunitaire (système du complément,...etc.). Leur concentration (20 % des protéines totales) décroît lorsque le débit salivaire augmente (**Li et al. 2020**).
- ✓ **Protéines intrinsèques** (synthétisées par les glandes salivaires elles-mêmes). Elles sont nombreuses.
- ✓ **Les mucines:** approximativement 16 % du total des protéines présentes dans la salive mixte sont de la famille des mucines. Elles sont sécrétées principalement par les cellules à mucus des glandes sublinguales. Ce sont des glycoprotéines ramifiées (75 % de protéines et 25 % d'hydrates de carbone). Ces glycoprotéines polymérisent en milieu aqueux et retiennent de grandes quantités d'eau, pour former un gel visqueux recouvrant les tissus de la cavité buccale, conférant ainsi à la salive son pouvoir lubrifiant. La meilleure lubrification est obtenue avec les mucines sécrétées à partir de glandes salivaires mineures (faible solubilité, haute viscoélasticité et adhésivité). Elles seraient aussi la première « ligne de défense » contre les effets préjudiciables des polyphénols dans l'alimentation par ce mécanisme d'agrégation (**Schenkels et al. 1995**).

- **Les enzymes salivaires**

- ✓ **L'alpha-amylase salivaire (ou ptyaline):** cette protéine représente 30% du total des protéines salivaires. Elle est sécrétée par les cellules contenant des grains de zymogène, en majorité parotidiennes. Elle participe à la dégradation de l'amidon alimentaire en maltose. Son action est de courte durée car inhibée par le pH acide de l'estomac après déglutition (**Schenkels et al. 1995**).
- ✓ **La lipase salivaire:** il existe également une lipase salivaire, produite au niveau des glandes sublinguales. Cette enzyme est assez active. On estime ainsi que chez l'homme, 20% à 30% des triglycérides peuvent être hydrolysés par la lipase salivaire avant d'atteindre l'intestin (où elle reste active, car résistante à un pH voisin de 2 et aussi, il hydrolyse les phospholipides, les esters de cholestérol, ainsi que de nombreux autres esters.
- ✓ **Le lysozyme:** celui-ci est présent à hauteur de 10% des protéines totales. Le lysozyme a aussi un pouvoir antiseptique et agit comme une enzyme lytique capable de lyser des bactéries à gram

positif. Elle est capable également de lyser la paroi des germes fongiques (**Scannapieco, 1994**).

✓ **Lactoperoxydases**: les peroxydases présentes dans la salive ont deux origines:

- **la lactoperoxydase salivaire humaine** (LPO-SH), synthétisée et sécrétée par les glandes salivaires. Elles sont des enzymes contribuant à rendre un milieu antiseptique en utilisant le thiocyanate (SCN) comme substrat. Le thiocyanate est oxydé par l'enzyme en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produisant des ions qui dénaturent les protéines bactériennes.
- **la myéloperoxydase** (MPO), synthétisée par les polynucléaires neutrophiles migrant dans la cavité orale par le sulcus gingival. Les MPO représentent entre 30 % et 75 % du total des peroxydases (**Hayat et al. 2014**).
- **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 (**Hayat et al. 2014**).

d. Autres constituants organiques

On retrouve en faible concentration de l'urée (environ 2 mmol/l), du glucose (0,056 mmol/l), de la créatinine, du cholestérol. Plus de 3 000 acides ribonucléiques (ARN) messagers ont été identifiés; leur dosage pourrait être un futur marqueur diagnostique des cancers de la sphère buccale. La salive contient aussi des facteurs de croissance, principalement le nerve growth factor (NGF) et l'epithelial growth factor (EGF), dont la sécrétion augmenterait au cours de certaines maladies parodontales. Des insulin-like growth factor (IGF) sont également retrouvés et des cytokines (**Li et al. 2020**).

1.3 Caractéristiques physico-chimiques de la salive

• **Le débit salivaire**

Le débit ou flux salivaire est très variable et dépend de nombreux facteurs. L'homme secrète entre 0,5 L à 1,5L par 24h, soit en moyenne 0,75L par jour. Le débit moyen au repos est compris entre 0,1 et 0,5ml/min, soit en moyenne 0,3ml/min (**Gasperment, 2018**).

• **Viscosité**

La viscosité de la salive est inversement proportionnelle au taux de cisaillement qui lui est appliqué. C'est une caractéristique non newtonienne commune aux fluides biologiques, difficile à reproduire *in vitro*, d'où les difficultés d'obtenir une salive artificielle mimant parfaitement ces propriétés. La viscosité de la salive n'est pas homogène (**Dame, 2015**).

• **PH**

Le pH salivaire est variable, au repos il est compris entre 6 et 7 mais il peut atteindre des valeurs jusqu'à 5,3 au minimum, et 7,8 au maximum. On considère un équilibre acido-basique ou homéostasie du pH influencé par différents facteurs: l'apport d'hydrogène dans la cavité buccale, le

débit salivaire (qui abaisse le pH), l'âge et certaines pathologies (comme le diabète et l'insuffisance rénale qui entraîne une diminution du pH) et le pouvoir tampon (**Gasperment, 2018**).

1.4 Mécanisme de formation

Le processus de sécrétion salivaire fait se succéder deux étapes, schématiquement:

- excrétion des protéines.
- ultrafiltration ionique au niveau des cellules acineuses (unité élémentaire de sécrétion).
- réabsorption sodique massive au niveau des cellules des canaux excréteurs intralobulaires.

La sécrétion des fluides et des électrolytes par les cellules acineuses nécessite la régulation coordonnée de multiples transporteurs d'eau, d'ions et de canaux protéiques. La clé de leur activation semble être l'augmentation intracellulaire de calcium. L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est, quant à lui, le médiateur principal de l'excrétion des protéines. Le contrôle de cette sécrétion est sous l'influence quasi exclusive du système nerveux végétatif (hormis l'influence de quelques hormones), par ses voies sympathiques et parasympathiques. Ces deux branches agissent de concert afin d'obtenir une salive plus ou moins abondante et/ou riche en composés organiques et inorganiques (**Bendrihem et Vacher, 2012**).

- **Production de la salive primaire**

La salive, dite **primaire**, est produite par gradient osmotique et mouvements ioniques (notamment K^+ , Na^+ et Cl^-) transcellulaires et paracellulaires à travers des canaux spécifiques divers (ioniques et aqua porines) (figure 1). La concentration des électrolytes de cette salive primaire est proche voire équivalente à celle du plasma, on considère alors cette sécrétion isotonique.

- **Modification en salive définitive**

Au niveau des canaux striés, on observe une réabsorption des ions Na^+ et Cl^- ainsi qu'une sécrétion de K^+ et HCO_3^- . La salive devient dès lors hypotonique par rapport au plasma et on parle alors de salive **définitive** (ou secondaire). Ces mécanismes sont dépendants du débit salivaire et certains systèmes sont saturables (**Gasperment, 2018**).

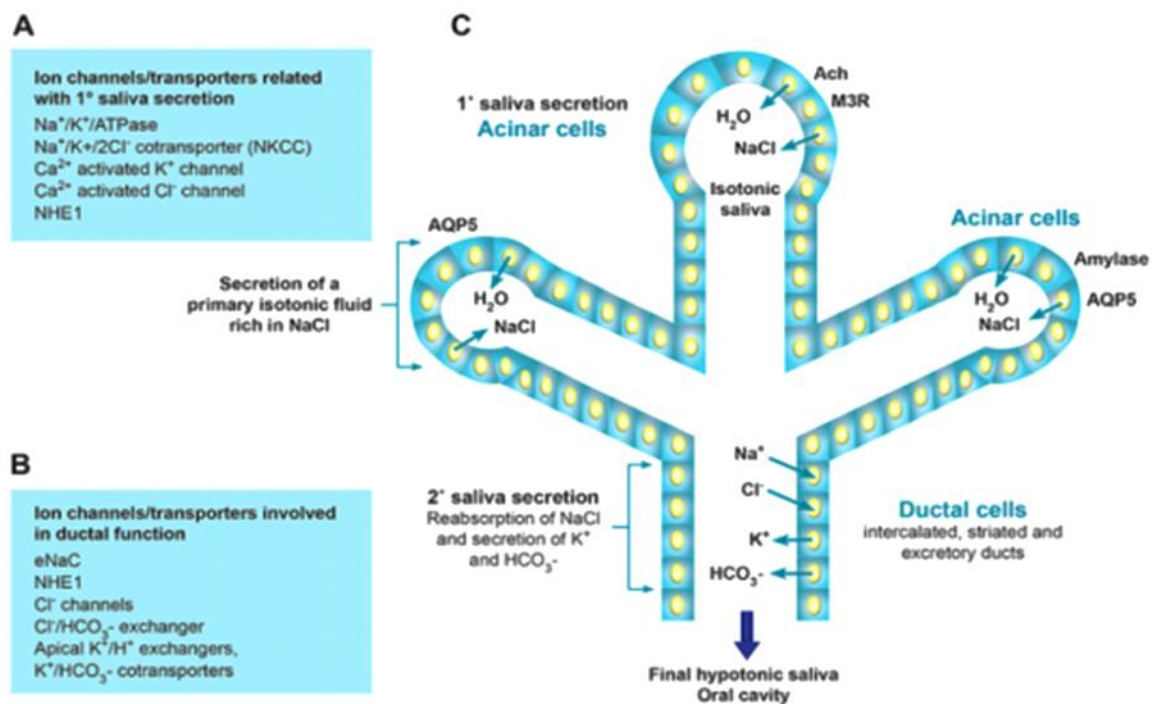


Figure 1: Formation de la salive (Gasperment, 2018).

1.5 Rôle de la salive

La salive a de multiples fonctions: mécanique, d'humidification et lubrification, protectrice, digestive, trophique pour les dents et fonction d'élimination (González, 2001), de détoxification, antioxydant (Sculley et Langley, 2003) et de homéostasie (Podrigalo et al. 2015).

➤ Protection et lubrification des muqueuses

Les mucines de la salive et les protéines riches en proline basiques glycosylées (PRP-g) jouent un rôle majeur dans la lubrification des tissus buccaux. Cette lubrification diminue les traumatismes provoqués par la mastication, la déglutition et la phonation sur les tissus mous. Elle limite aussi la déshydratation buccale induite par la respiration. Le caractère viscoélastique de la salive aide à maintenir un film continu et intact sur les tissus mous et durs. Quand le flux salivaire est diminué, des zones de muqueuse non protégées apparaissent, deviennent plus sensibles à l'abrasion et s'ulcèrent. La salive agit enfin comme une barrière contre les irritants (Castro et al. 2016).

➤ Pouvoir tampon

Le pouvoir tampon de la salive augmente avec la stimulation; il est presque inefficace pendant les périodes de faible débit (le pH salivaire peut descendre alors à un niveau de 5,3). Les couples acide-base sont des systèmes tampos qui permettent de réguler l'homéostasie du pH et sont principalement

représentés dans la salive par les ions bicarbonates mais également par les ions phosphates, l'urée, d'amphotères et de certaines protéines et enzymes. Les bicarbonates ont un rôle prépondérant dans la neutralisation des acides de par leurs propriétés intrinsèques (**Lecor et al. 2013; Gasperment, 2018**).

➤ **Maintien de l'intégrité des tissus dentaires**

Les tissus dentaires peuvent subir des pertes de substance par des mécanismes variés comme l'abrasion, l'attrition et l'érosion. L'abrasion est due au frottement de corps étrangers contre les dents. La plupart des aliments que nous mangeons ne sont pas abrasifs et ne sont pas une source fréquente de perte d'émail qui est sensible à un environnement dont le pH est inférieur à son pH critique. Pour la salive, le pH critique à l'égard des minéraux dentaires est compris entre 5,5 et 6,5. Donc, l'effet protecteur de la salive repose sur son action lubrifiante par formation de la pellicule exogène acquise sur émail. La salive inhibe les phénomènes de déminéralisation grâce à son pouvoir tampon, qui contrôle la neutralité du pH salivaire (**Devoize et Dallel, 2010**).

➤ **Propriétés antimicrobiennes**

Une quatrième fonction de la salive est son activité antimicrobienne. Les glandes salivaires sécrètent un fluide contenant des agents immunologiques et non immunologiques, impliqués dans la protection des dents et les muqueuses. Le contenu immunologique de la salive repose sur la présence d'IgAs, d'IgG et d'IgM. Le contenu non immunologique est représenté par de nombreuses enzymes et protéines. Le mécanisme antimicrobien se résume souvent en une interaction entre les molécules de surface des éléments pathogènes et les cellules immunitaires afin de faciliter leur reconnaissance, puis leur élimination. Ce phénomène est amplifié par le mouvement de la langue et des lèvres (**Dame et al. 2015**).

➤ **Gustation, déglutition et digestion**

La salive facilite la formation du bol alimentaire, ainsi que la déglutition, grâce aux substances mucilagineuses qu'elle contient. Les enzymes telles l' α -amylase et la lipase, participent aux premières étapes de la digestion des sucres et des graisses. La salive joue également un rôle dans la gustation. Les aliments contiennent des substances gustatives diverses telles que des minéraux, des ions, des polysaccharides et des acides aminés (**Ohshiro et al. 2007; Basir et al. 2017**).

2. Les glandes salivaires

2.1 Anatomie

Les glandes salivaires principales sont classiquement situées dans le plancher de la bouche pour la glande sublinguale, dans la région submandibulaire pour la glande submandibulaire et dans la région parotidienne pour la parotide (**Nicholas et al. 2019**). Paradoxalement, on pourrait soutenir

que les glandes salivaires mineures sont les plus importantes car de leurs composants protecteurs (Li et al. 2020).

2.2 Les types des glandes salivaires

Les glandes salivaires principales sont classiquement décrites comme des glandes situées dans des loges anatomiques individualisées (Bennick, 1975).

2.2.1 Glandes salivaires majeures

Elles sont au nombre de six (deux de chaque côté). Elles sont anatomiquement bien délimitées et présentent une architecture interne complexe; les glandes parotides, les glandes submandibulaires et les glandes sublinguales (Neyraud, 2012).

➤ Glandes parotides

Sont les plus volumineuses des glandes salivaires. Elles sont de forme pyramidale, moulées sur les parois de la loge parotidienne entre le muscle masséter et la peau (Devoize et Dallel, 2010).

➤ Glandes submandibulaires

Les glandes submandibulaires ont la taille d'une grosse amande. Elles sont situées dans la partie latérale de la région sus-hyoïdienne et longent la base de la branche horizontale de la mandibule (Devoize et Dallel, 2010).

➤ Glandes sublinguales

Les glandes sublinguales sont de forme allongée et aplatie transversalement. Chacune d'elles repose sur le plancher de la bouche entre la mandibule et le muscle génioglosse (Devoize et Dallel, 2010).

2.2.2 Glandes salivaires « mineures »

Les glandes salivaires « mineures » ou « accessoires » sont les seules annexes de la muqueuse buccale (figure 2). Grâce à leur sécrétion salivaire continue, elles assurent l'humidification permanente de la cavité buccale. Très nombreuses, elles sont disséminées sur toute la surface de la muqueuse buccale (Devoize et Dallel, 2010).

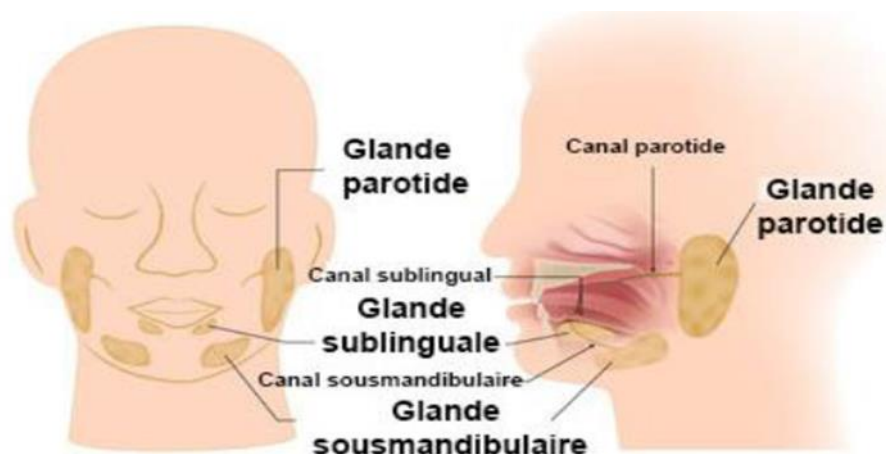


Figure 2: Anatomie des glandes salivaires (Couquet, 2017).

2.3 Histologie des glandes salivaires

Les glandes salivaires principales sont des structures canalaux ramifiées, organisées en lobes et lobules avec des terminaisons sécrétoires s'ouvrant sur la cavité orale.

➤ Mode de sécrétion salivaire

Les glandes salivaires secrètent des substances destinées à être expulsées de l'organisme dans le milieu extérieur: c'est un mode de sécrétion exocrine. Ce mécanisme d'excrétion est merocrine via un phénomène d'exocytose: les éléments produits sont enveloppés dans une vésicule qui va migrer vers la membrane cellulaire apicale et déverser son contenu dans la lumière canalaire. On décrit également des mécanismes transcellulaires de diffusion passive (par transport sélectif, canaux ioniques et aquaporines) et paracellulaires (ultrafiltration par jonctions communicantes **(Gasperment, 2018)**).

➤ L'acinus

Désigne une cavité épithéliale arrondie bordée par des cellules sécrétrices qui se déversent dans un canal excréteur. Ces cellules dites acineuses sont entourées de matrice extracellulaire et d'un environnement cellulaire riche (cellules immunitaires, endothéliales) **(Gasperment, 2018)**.

➤ Les éléments excréteurs

Sont constitués de quatre grands types de canaux qui se succèdent: les canaux intralobulaires comprenant les canaux intercalaires et les canaux striés, les canaux interlobulaires et le canal collecteur débouchant dans la cavité buccale **(Gasperment, 2018)**.

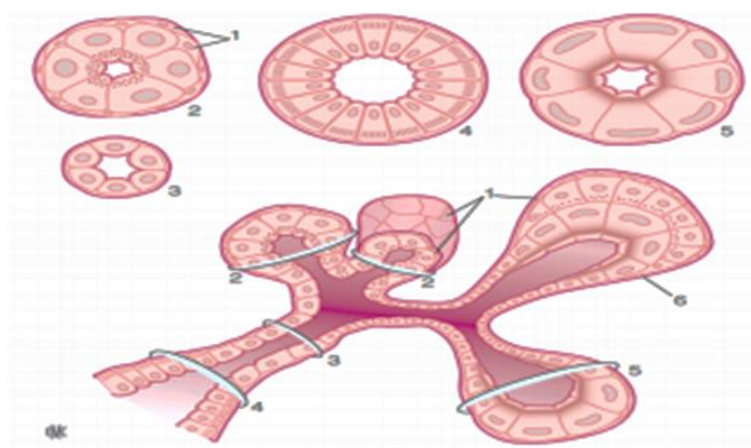


Figure 3: Structure histologique des différents types d'acini et canaux glandulaires **(Devoize et Dallel, 2011)**. 1. cellules myoépithéliales; 2. acinus séreux; 3. canal intercalaire; 4. canal strié; 5. acinus muqueux; 6. acinus mixte séro-muqueux.

Les biomarqueurs

1. Les biomarqueurs

1.1 Définition

La définition officielle d'un biomarqueur est « une caractéristique objectivement mesurée et évaluée comme indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathogènes ou des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique» (**Diamandis, 2010; Gondret et al. 2020**). Lorsque le paramètre utilisé est le résultat d'un dosage ou d'une mesure à partir d'un échantillon biologique, le terme de biomarqueur est utilisé (**Charpentier, 2011; Longrois et Provenchère, 2017**).

Dans le domaine médical, un biomarqueur peut être utilisé pour le dépistage médical (recherche d'une maladie dans une population), le diagnostic (caractérisation d'une maladie chez un individu), la réponse à un traitement médical, la rechute après un traitement, la toxicité d'une molécule (**Gosho et al. 2012**). Le biomarqueur est alors le plus souvent une protéine. Les plus anciens biomarqueurs sont des indicateurs de masse tumorale (**Chenevier-Gobeaux et al. 2010**).

1.2 Les types de biomarqueurs

D'après les instituts américains de la santé (NIH), un biomarqueur, ou marqueur biologique, est une « caractéristique mesurée objectivement et évaluée comme un indicateur d'un processus biologique normal, pathologique ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique » (**Bernard, 2009**). Beaucoup de ces molécules sont présentes dans la salive à des concentrations plus élevées que dans le sang (**Verstraete et Labat, 2009**).

Les biomarqueurs peuvent être classés en quatre groupes différents:

- **Les marqueurs pronostiques (diagnostiques)** sont des marqueurs permettant de séparer une population suivant des caractéristiques évolutives propres.
- **Les marqueurs prédictifs** permettent d'estimer le succès du traitement mis en place.
- **Les biomarqueurs pharmacodynamiques** reflètent l'effet d'une molécule sur les cellules hôtes (saines ou tumorales) et permettent de définir les doses de médicaments à utiliser.
- **Les marqueurs de substitution** sont des marqueurs permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement en l'absence de données cliniques (**Bruno, 2015**).

1.3 Les critères d'un biomarqueur

La mesure d'un biomarqueur doit être sensible (détecter des concentrations faibles) et spécifique (sans interférence avec d'autres molécules surtout les métabolites) et faire des tests rapide (**Verstraete et Samyn, 2003**).

La performance diagnostique d'un biomarqueur peut varier en fonction de la population étudiée et de ces caractéristiques démographiques (âge, sexe) ou pathologiques (sévérité de la maladie, formes

cliniques, sélection).

La mesure du biomarqueur est associée à une incertitude de mesure analytique. Aussi la précision de cette mesure doit être donnée (reproductibilité) ainsi que la limite de détection.

L'étude d'un biomarqueur est trop souvent effectuée avec une méthodologie générale et statistique médiocre qui limite considérablement la portée scientifique du message et sa reproductibilité (**Bruno, 2015**).

1.4 L'intérêt clinique d'un biomarqueur

Les progrès dans les techniques d'analyse génétique, protéique et cellulaire, surtout depuis le séquençage du génome humain. Ils s'agissent alors d'identifier les variations qui permettront de distinguer l'individu sain du malade. Un biomarqueur est utilisé pour prédire un diagnostic, évaluer une gravité, ou prédire une réponse (efficacité, toxicité, pharmacocinétique) thérapeutique (théranostique). Certains biomarqueurs peuvent servir d'outils lors du développement clinique d'une nouvelle approche thérapeutique:

- Ils permettent de mesurer l'efficacité d'un nouveau médicament.
- Ils s'inscrivent dans une dimension stratégique et économique.
- Ils ont la capacité de transformer le développement et la commercialisation d'un nouveau médicament en un processus plus rapide et moins coûteux.
- Ils peuvent jouer un rôle à un stade «pré-clinique» de développement de nouveaux médicaments.
- Ils deviennent ainsi un compagnon de route dans le développement précoce d'une nouvelle thérapie.
- Ils facilitent la prise de décision de passer d'un stade pré-clinique à une étude clinique.

Plusieurs étapes d'importance croissante président à la démonstration de l'intérêt clinique d'un biomarqueur:

- Démontrer que le biomarqueur est significativement modifié chez les malades par rapport aux témoins non malades.
- Evaluer les propriétés diagnostiques du biomarqueur en le comparant à celles de la méthode de référence (**Bruno, 2015**).

1.5 Recherche et validation d'un biomarqueur

Une phase exploratoire préclinique de recherche de candidats biomarqueurs par comparaison d'un groupe malade et d'un groupe témoin (**Pepe et al. 2001**).

- Le développement d'un test clinique reproductible sur un échantillon représentatif de la population-cible.
- Une étude clinique rétrospective de validation sur une population malade.
- Une étude clinique prospective sur la population-cible pour déterminer l'utilité du biomarqueur.

- Etude prospective d'impact pour valider l'intérêt clinique du biomarqueur (**Chenevier-Gobeaux et al. 2010**).
- La validité externe passe impérativement par l'étude d'une cohorte différente de celle qui a permis l'observation des résultats (**Bruno, 2015**).

1.6 La salive, source de biomarqueurs

La salive est principalement sécrétée par les glandes salivaires, et ses informations biomolécules (ADN, ARN, protéines, métabolites et microbiote) sont obtenues à partir des glandes salivaires par voie orale, cellules muqueuses, microbiote oral et gingival fluide (figure 4) (**Zhang et al. 2014**).

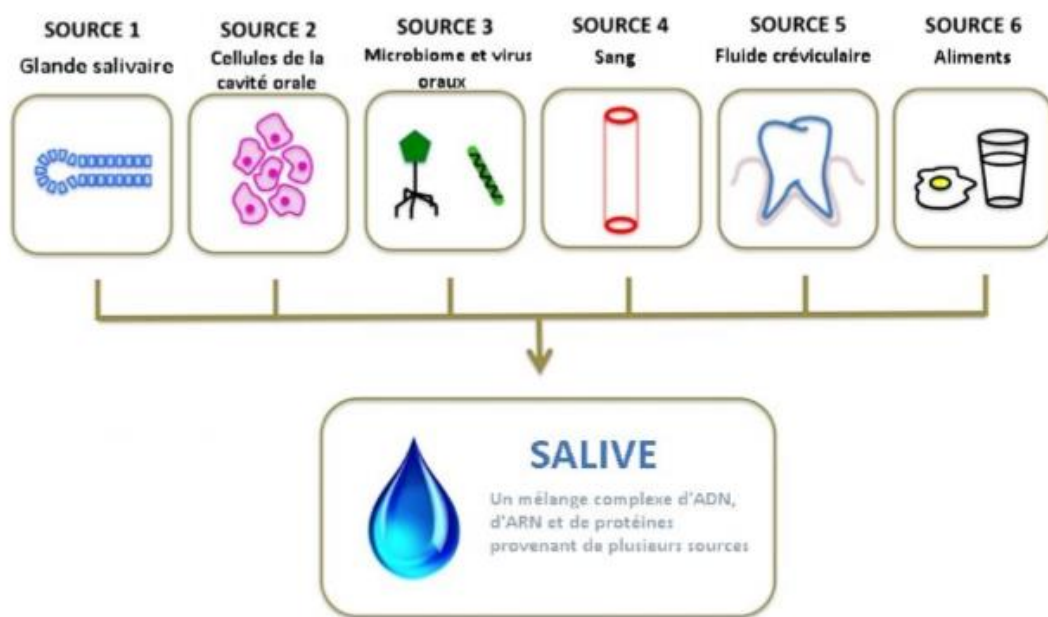


Figure 4: La salive est composée de l'écules et fluides de différentes sources (**Zhang et al. 2014**).

Il y a eu une croissance rapide de l'intérêt et de l'adaptation de la salive en tant qu'échantillon de diagnostic au cours de la dernière décennie, et au cours des dernières années en particulier, il y a eu des développements majeurs impliquant l'application de la salive en tant qu'échantillon cliniquement pertinent. La salive offre une « fenêtre » sur la santé buccodentaire et systémique d'un individu et, comme d'autres fluides corporels, la salive peut être analysée et étudiée pour diagnostiquer des maladies (**Rehan et al. 2016**).

1.7 Préparation des échantillons salivaires

- Les techniques de prélèvement varient et dépendent notamment de la nature du biomarqueur recherché. On distingue les méthodes de prélèvement par canule, par absorption ou par « crachat salivaire ». Ces analyses peuvent intéresser la salive stimulée ou non stimulée, le type de stimulation pouvant être gustatif par l'acide citrique ou par mastication. Une

augmentation du débit se traduit par une diminution de concentration des composants salivaires si bien que les prélèvements portent principalement sur la salive non stimulée. On peut évoquer également la commercialisation de dispositifs spécifiques incluant un rinçage, mais la présence d'additifs et le pH de la solution auraient une influence sur certains analytes (par exemple l'acide citrique modifierait la concentration de certaines hormones comme le cortisol et la testostérone).

- Pour le conditionnement de l'échantillon, la salive obtenue est soumise à centrifugation en utilisant des stabilisateurs et inhibiteurs de protéases.
- Le stockage se fait dans un environnement réfrigéré (4°, -20° ou -80° selon le biomarqueur et le temps de conservation).
- L'analyse de biomarqueurs se fait grâce à des techniques de biologie moléculaire permettant leur identification, leur quantification, voir même leurs modifications structurales. Les méthodes employées font intervenir et combiner des techniques d'amplification, de séparations et de détection d'immunohistochimie comme: la spectrométrie de masse, l'électrophorèse sur gel l'immunomarquage couplé à un agent fluorescent ou enzymatique (ELISA), l'immunotransfert « blotting », la chromatographie en phase liquide....

Méthodologie de l'étude

1. Objectif

Notre objectif a été d'illustrer la contribution de l'analyse protéomique dans la recherche de biomarqueurs protéiques de maladies (dépistage, diagnostic, pronostic, suivi de l'efficacité d'un traitement....) ou même de processus physiologiques en analysant et discutant des études basées sur différentes variantes d'analyse protéomique. Pour cela, différentes pathologies ont été traitées dans l'analyse: la dystrophie musculaire, le diabète de type, cancer de foie, cancer du cou et le carcinome épidermoïde de la cavité buccale...etc. L'ovulation a été choisie comme exemple de processus biologique.

2. Schéma de l'étude

Nous avons réalisé une synthèse des données de la littérature internationale concernant les stratégies de recherche de biomarqueurs salivaires par l'approche protéomiques puis une analyse des articles concernés a été entreprise:

2.1 Recherche bibliographique

La recherche documentaire a été effectuée dans les bases de données suivantes: PubMed; Research; Sensors et Google Scholar. Les bases des données ont été explorées de mars à juillet 2020, les critères d'inclusion suivants ont été suivis:

- La date de parution supérieure ou égale à 2008.
- Les articles portant sur la recherche des biomarqueurs de maladies ou de processus physiologiques.
- Les articles sont en plusieurs langues (français et anglais).
- Les articles disposant un résumé.

2.2 La sélection des articles

Une première lecture sur titre, puis sur résumé a permis d'inclure les articles répondant aux critères d'inclusion mentionnés ci-dessus:

- Les articles retenus ont été lus en entier afin de statuer sur leur inclusion.
- Les articles sont des articles de recherche.

2.3 Analyse des articles sélectionnés

Les articles sélectionnés ont été triés et analysés en considérant le type de la pathologie. L'analyse a été entreprise en précisant:

- l'objectif principal (dans l'introduction).
- la méthodologie d'étude.
- les principaux résultats.
- conclusion tirée par les auteurs.

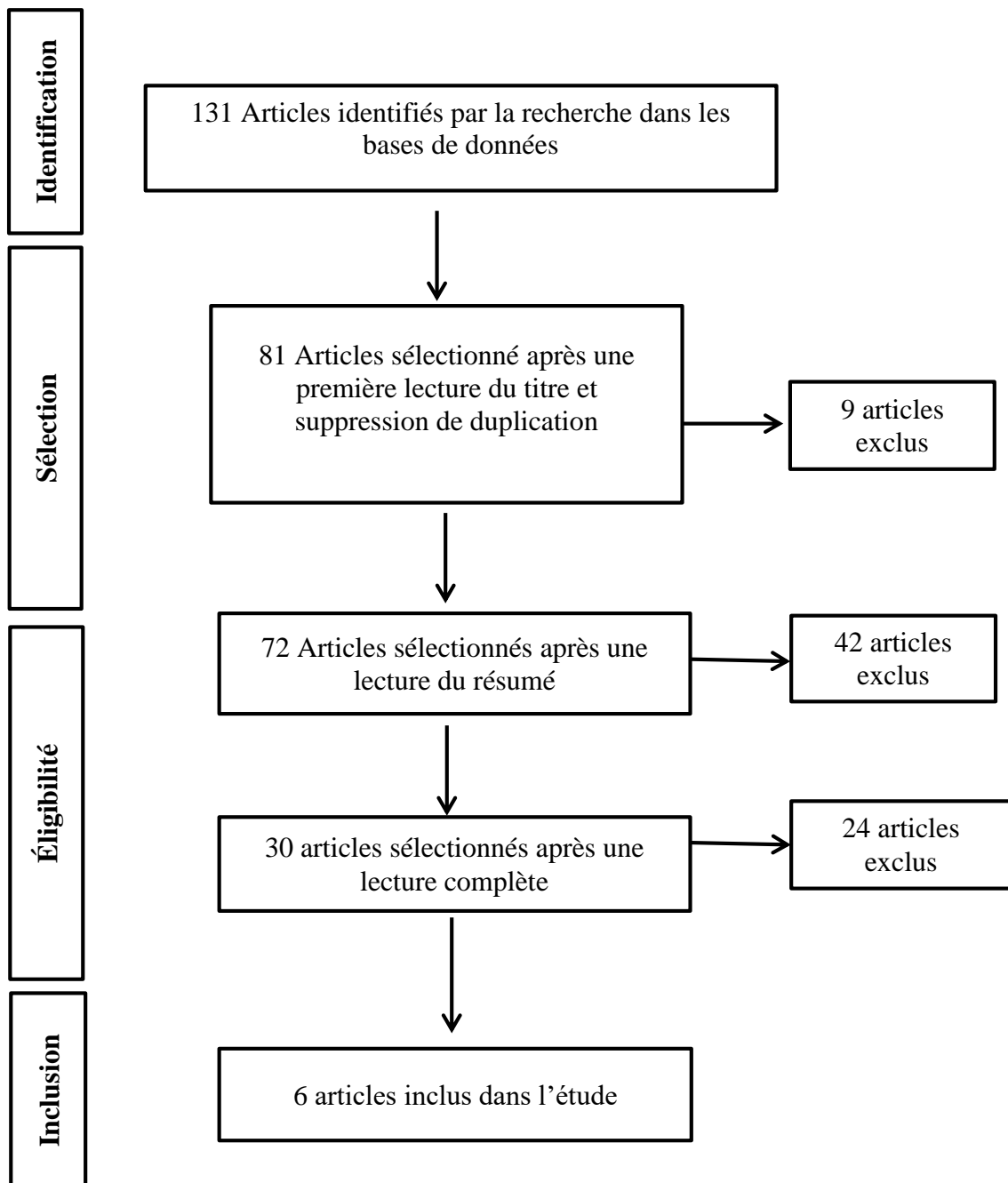


Figure 5: Schéma présentant les paramètres de recherche et les résultats de sélection.

Résultats de l'analyse

Nous avons identifié six articles pertinents concernant la problématique de la recherche:

1. Article de Murphy et al. 2019

Proteomic identification of elevated saliva kallikrein1 levels in the mdx-4cv mouse model of Duchenne muscular dystrophy

Introduction: La protéomique quantitative des fluides corporels comme la salive est la base d'identification des changements pathobiochimiques locaux et systémiques et le potentiel de diagnostic et pronostic des maladies. L'objectif de la présente étude est la description des résultats de l'analyse protéomique comparative d'échantillons de salive entière provenant du type sauvage par rapport au modèle établi de souris mdx-4cv de dystrophie musculaire hautement progressive, en se concentrant sur la famille de protéines kallikreines.

Méthode: Dans cette étude, les échantillons salivaires ont été obtenus à partir de deux types des souris (C57BL et mdx-4cv) de 6mois. Une digestion des protéines salivaires a été faite pour l'analyse LC MS/MS. L'identification et la quantification du taux de klk1 dans le sérum et la salive est réalisée par le logiciel protéome Discover; quantification absolue par le logiciel MAXQUANT et ANDROMEDA et quantification relative par le logiciel MaxLFQ.

Résultats

- Apparition des isoformes de klk1 et les 13 peptides apparentés à klk1 dans les salives et les sérums.
- A partir de profilage protéomique de souris dystrophiques mdx-4cv, il y a une augmentation de taux de klk1 et à partir de la spectrométrie de masse, il y a une apparition des peptidases apparentées à klk1 dans la salive et le sérum de souris normales (b1, b3, b4, b5, b8, b9 ...).
- Il y a une différence entre les protéines de la salive et les protéines sériques.
- La salive de souris normales montre une expression protéique comparable à la salive de souris mdx-4cv.
- L'augmentation de la concentration de klk1 dans la salive est plus importante que dans le sérum chez la souris mdx-4cv avec une masse de klk1 dans la salive de 30kDa.
- Chez les souris mdx-4cv, il y a une surexpression des gènes codant pour les klk13, 16 et 26.

(A) Mass spectrometric identification of Kallikrein-1 in wt and mdx-4cv saliva

Kallikrein-1: 13 peptides, 3 unique peptides, 37% sequence coverage, 28.8 kDa, pI 5.12

MRFLILFLALSLGGIDAAPPVQSRIVGGFNCEKNSQPWQVAVYRFTKYQCGGILLNANWVL
 TAAHCHNDKYQVWLGNNFLEDEPSAQHRLVSKAIPHPDFNMSLLNEHTPQPEDDYSNDLM
 LLRLKKPADITDVVKPIDLPTEEPKLGSTCLASGWSITPVKYEYPDELQCVNLKLLPNE
 CAAHIEKVTDDMLCAGDMDGGKDTGAGDSGGPLICDGVLQGITSWGSPCGKPNVPGIYT
 RVLNFTWIRETMAEND

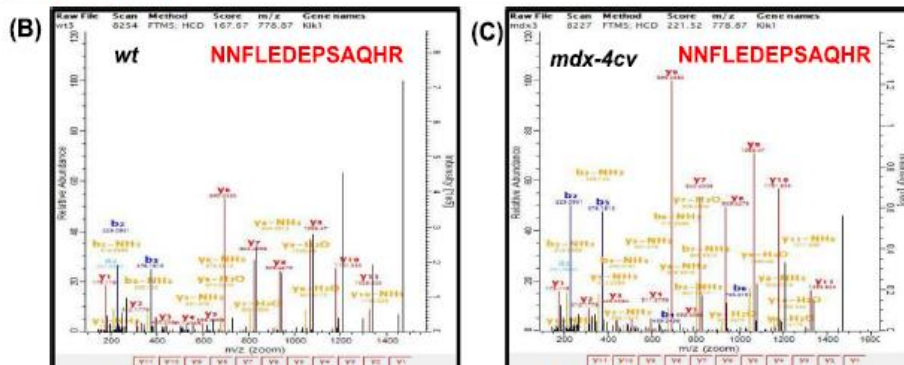


Figure 5: Identification protéomique de l'isoforme kallibréine Klk1 dans la salive à partir du modèle murin mdx-4cv de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Conclusion: La protéomique comparative a montré que la klk1 salivaire peut être considérée comme un candidat biomarqueur potentiel pour l'étude et le diagnostic de la dystrophie musculaire des souris mdx-4cv. Ce biomarqueur peut être aussi un témoin pour l'évaluation des approches thérapeutiques.

2. Article de Pappa et al. 2018

Saliva proteomics analysis offers insights on type 1 diabetes pathology in a pediatric population

Introduction: La salive ouvre un domaine de diagnostic de beaucoup de pathologies par rapport au sang à partir de l'analyse des protéines salivaires spécifiques à l'aide de profilage protéomique. L'objectif de cette étude est d'étudier et caractériser les protéines impliquées dans la physiopathologie du diabète de type 1 par l'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution.

Méthode: Dans cette étude, la technique iTRAQ a été utilisée pour détecter les protéines entre les 3 groupes (G1; 12 patients diabétiques de type 1, G2; 12 patients avec un indice glycémique satisfaisant et G3; 12 patients sains). Les étapes de l'étude sont résumées dans le schéma suivant:

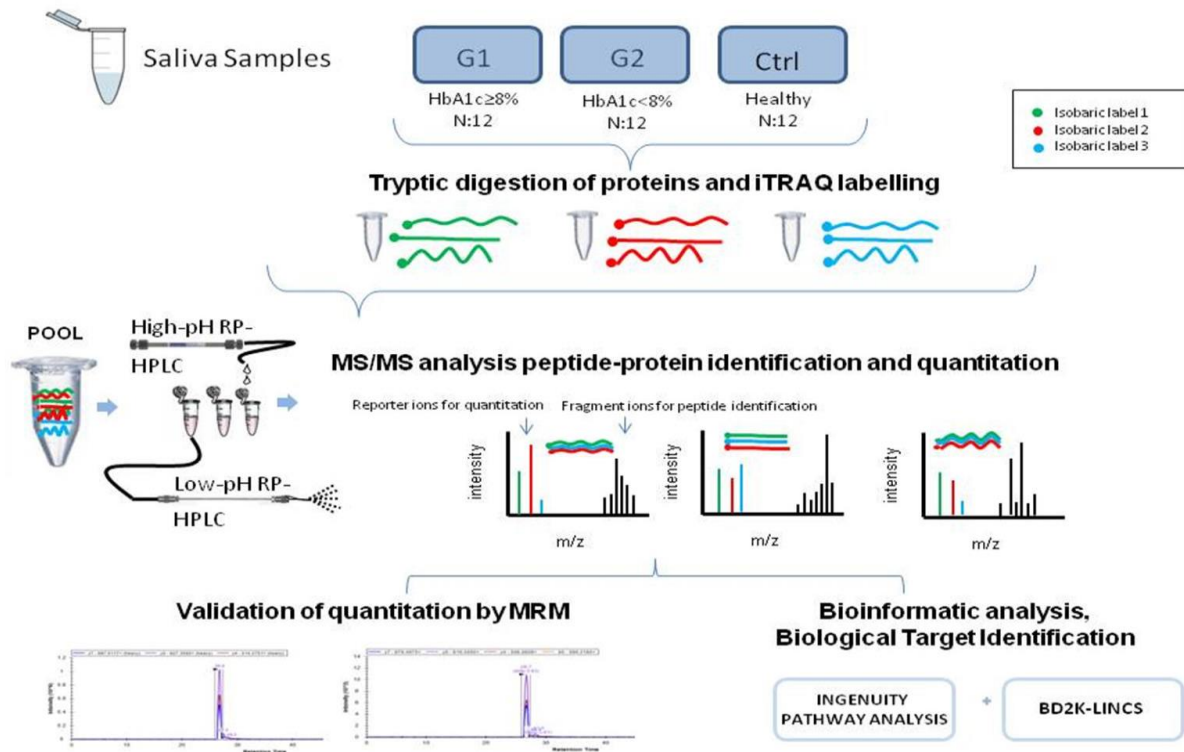


Figure 6: Résumé graphique décrivant l'analyse protéomique et bioinformatiques des échantillons salivaires.

Résultats

- Dans l'analyse protéomique comparative: les protéines présentes à un pourcentage supérieur ou égal à 70% de l'échantillon dans chaque groupe ont été sélectionnées (soit 2031 protéines).
- La classification fonctionnelle de ces protéines révèle que les principaux groupes fonctionnels du protéome salivaire sont des enzymes et des cytokines.
- Toutes les comparaisons possibles ont été réalisées entre les trois groupes: 33 protéines différemment exprimées entre G1-Ctrl, 37 entre G2-Ctrl et 61 entre G1-G2.

- G1/G Ctrl: protéines les moins abondantes: S100-A7 et DEFBA4.

Protéines les plus abondantes: ATPase IF transporteurs des phospholipides suivie par DENR et KRT75.

- G2/G Ctrl: protéines les moins abondantes: SETD2 puis HIVEP2 et HIPSE.

Protéines les plus abondantes: KRT75 puis KRT12.

- G1/G2: protéines les moins abondantes: KRT75 puis KRT12 et CYP1A1.

Protéines les plus abondantes: PKHD1.

- Les patients avec un indice glycémique satisfaisant et les personnes saines présentent des profils protéiques comparables.
- En revanche, un nombre important de protéines différemment exprimées ont été identifiées dans la salive des patients diabétiques par rapport aux patients ayant un bon indice glycémique et personnes saines.
- Ces protéines sont impliquées dans les processus biologiques du diabète tel que les dommages endothéliaux et l'inflammation.
- A partir de l'analyse bioinformatique entre les groupes, il y a une signalisation de l'athérosclérose et une activation des molécules responsables de cardio-hépatotoxique et néphrotoxicité. En outre, une approche thérapeutique putative a été déterminée à partir de l'analyse bioinformatique des protéines salivaires sous ou surexprimées.

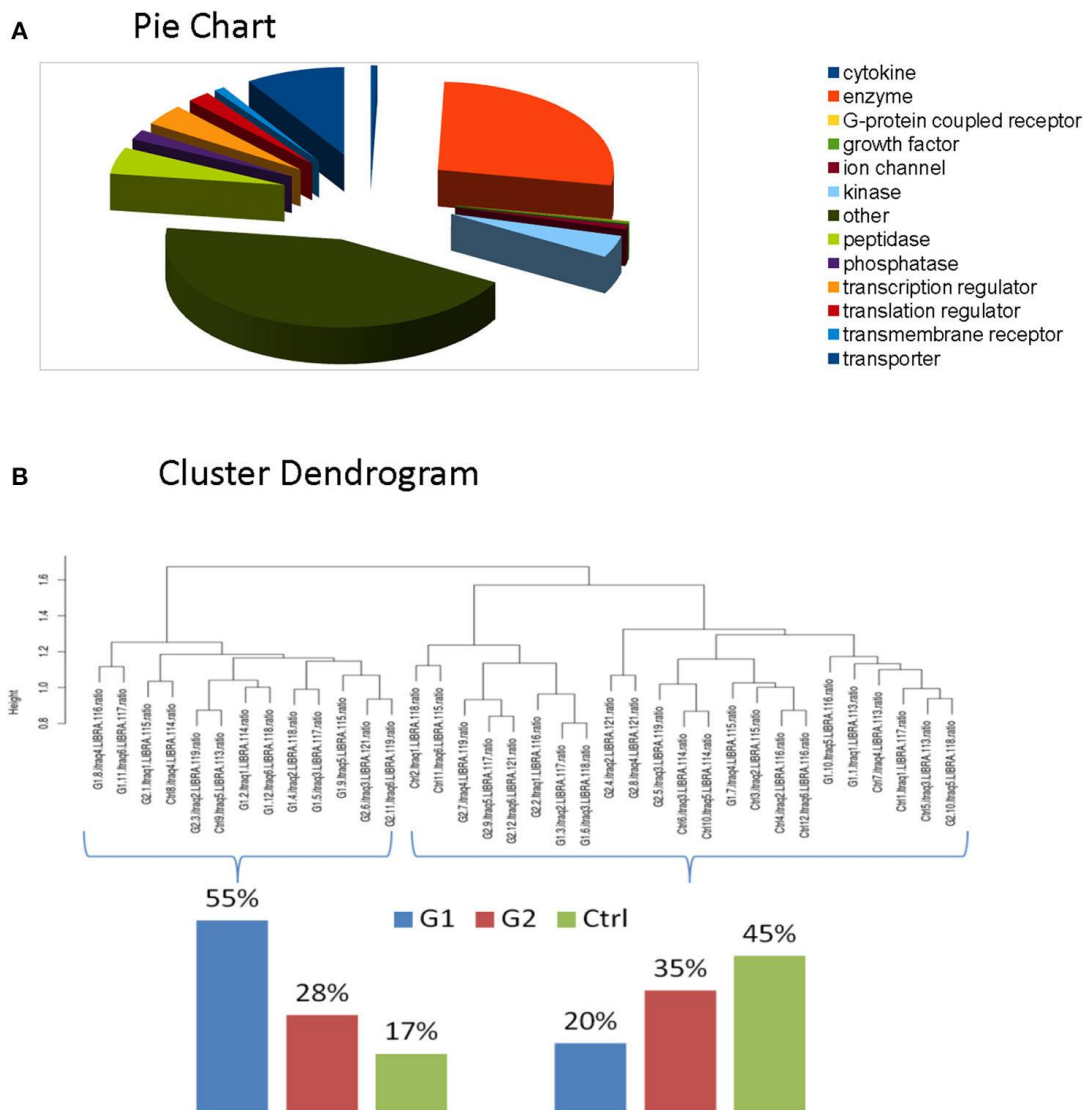


Figure 7: (A) La classification fonctionnelle des protéines a révélé que les enzymes et les cytokines

étaient les principaux groupes fonctionnels du protéome salivaire.

(B) L'analyse en cluster indique que le profil protéomique total est capable de distinguer les sujets diabétiques des sujets à bon indice glycémique et sujets en bonne santé. Les derniers (sujets à bon indice glycémique et des sujets en bonne santé) présentent des similitudes, comme prévu.

Conclusion: L'étude protéomique de haute qualité constitue une source d'informations sur les maladies. Ainsi, une caractérisation approfondie des protéines salivaires chez les enfants diabétiques a établi un lien entre les changements moléculaires et la pathologie. Cette approche protéomique et bioinformatique met en évidence le potentiel des diagnostics salivaires dans la pathologie du diabète et ouvre la voie au traitement préventif de la maladie.

3. Article de Ding et al. 2019

ITRAQ-based proteomics reveals SOD2 as a potential salivary biomarker in liver cancer

Introduction: L'analyse du protéome salivaire a été largement employée dans l'étude d'un large éventail de cancers, mais pas dans le carcinome hépatocellulaire. L'objectif de cette étude est d'identifier un ou des biomarqueurs salivaires pour le dépistage du cancer du foie.

Méthode: Dans cette étude, la technique iTRAQ (étiquette isobare pour la quantification relative et absolue) basée sur l'analyse protéomique quantitatif a été utilisée pour détecter les protéines exprimées différemment entre les échantillons de salive de 15 patients ayant le carcinome hépatocellulaire (3 groupes de 5 patients chacun) et 15 témoins sains. La technique iTRAQ est basée sur un marquage isotopique in vitro permettant d'identifier et de quantifier des protéines in vitro dans des échantillons différents par MS /MS). Le test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) a été effectué pour la vérification. Pour déterminer les caractéristiques fonctionnelles des protéines différemment exprimées, l'outil d'analyse en ligne DAVID a été utilisé (déterminer l'ontologie des gènes enrichie: GO).

Résultats

- Dans l'ensemble, 133 protéines ayant un niveau d'expression différentiel significatif (ratio $>1,5$ ou $<0,67$; $P < 0.05$) ont été détectées, à savoir 77 protéines significativement surexprimées et 56 protéines significativement sous exprimées dans les répétitions de tous les groupes malades.

- Avec des scores d'interaction supérieurs à 0,7; 39 protéines qui ont formé 28 associations protéine-protéine de confiance élevée ont constitué un complexe, multicentrique (figure 8). Douze gènes étaient des gènes concentrateurs importants interagissant avec au moins deux autres gènes du réseau d'interaction.

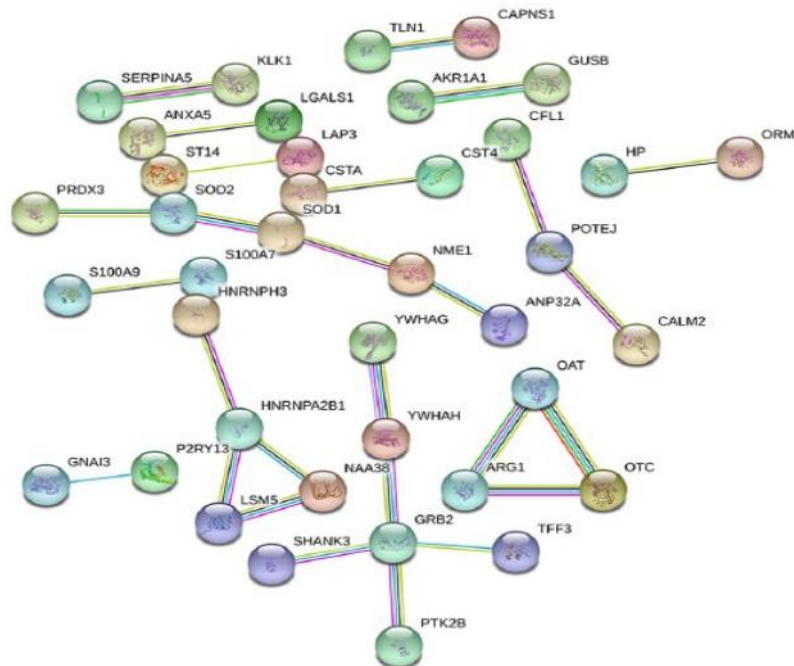


Figure 8: Le réseau d'interaction protéines-protéines déterminé par STRING sur les protéines exprimées différemment.

- Les interactions des protéines exprimées différemment sont obtenues en recherchant la base de données STRING avec une coupure de confiance de 0,7. Les nœuds déconnectés ne s'affichent pas.

- À l'aide de l'analyse bioinformatique (Chromatographie liquide-spectrométrie de masse / analyse MS) deux protéines candidates ont été finalement sélectionnées pour la vérification par ELISA à savoir, la SOD2 et HP (figure 9). La surexpression de la superoxyde dismutase 2, mitochondriale (SOD2) dans les échantillons des malades, confirmée par ELISA donne une valeur d'aire sous la courbe de 0.9082.

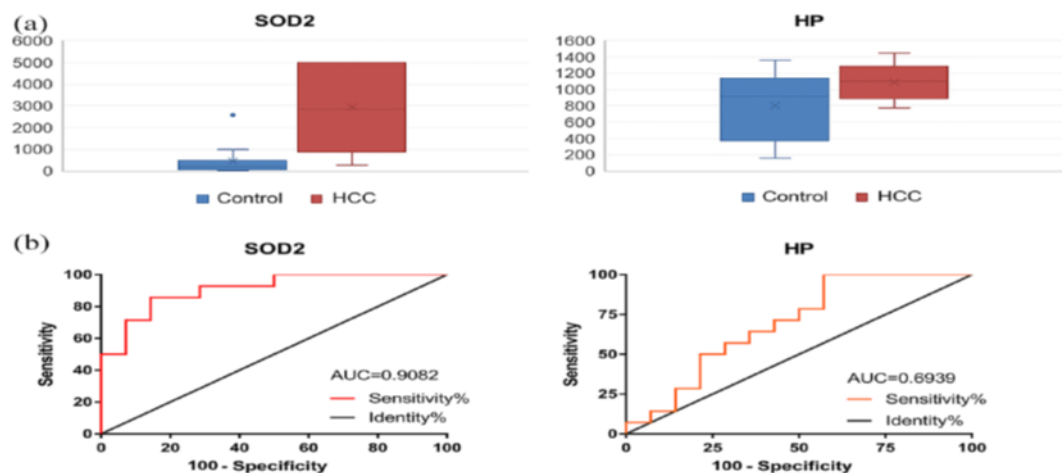


Figure 9: Évaluation et validation des biomarqueurs salivaires. a) Données de quantification ELISA de SOD2 et HP dans la salive de 14 patients atteints de HCC et de 14 témoins sains. b) Courbes ROC pour SOD2 et HP. ELISA: essai immunosorbent lié aux enzymes; HCC: carcinome hépatocellulaire; HP: haptoglobine; ROC: caractéristique de fonctionnement du récepteur.

Conclusion: La protéomique quantitative basée sur iTRAQ a indiqué que SOD2 pourrait servir de biomarqueur salivaire potentiel pour la détection du cancer du foie. Ces résultats indiquent qu'un essai salivaire non invasif et peu coûteux pourrait être établi pour la détection de carcinome hépatocellulaire.

4. Article de Dowling et al. 2008

Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression metastasis

Introduction: Le développement de nouveaux diagnostics protéomiques demeure essentiel pour la détection précoce et la surveillance du carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma). L'objectif de cette étude était d'identifier les protéines différemment exprimées dans la salive des patients HNSCC par rapport à un groupe témoin.

Méthode: Les échantillons de salive de 8 personnes atteintes d'affections non malignes de la région de la tête et du cou ont été utilisés comme groupe témoin et comparés à la salive de huit patients atteints de HNSCC en utilisant une analyse 2D DIGE et l'imagerie sur gel et une identification par spectrométrie de masse en tandem par analyse LC MS/MS ultérieure des protéines candidates.

Résultats: Six protéines sont révélées avoir des niveaux d'abondance nettement différents par rapport aux témoins. Les protéines ayant des niveaux d'expression les plus élevés dans la salive HNSCC comparées au groupe témoin sont: la bêta fibrine, la protéine de liaison au calcium S100, la transferrine, la cofiline-1 et la région constante de chaîne lourde d'immunoglobuline gamma 2. La transthyrétine avait un niveau d'abondance plus faible dans la salive HNSCC par rapport au groupe témoin (tableau 2).

Tableau 1: Protéines dont les niveaux d'abondance ont augmenté ou diminué dans la salive HNSCC par rapport au groupe témoin.

Position sur le gel	Protein ID	Protein AC	Ratio moyen	Méthode d'identification	Nombre de peptides appariés
1	Transthyréline	gi 339685	-2.92	LC-MS	4
2	Transferrin gi	gi 37747855	3.37	LC-MS	16
3	S100 protéine de liaison au calcium A9 (calgranuline B)	gi 56205191	5.35	LC-MS	4
4	Chaîne lourde d'immunoglobuline région constante gamma 2	gi 12054074	3.28	LC-MS	8
5	Fibrine bêta gi	gi 223002	2.77	LC-MS	11
6	Cofilin 1 (non musculaire)	gi 30582531	6.42	LC-MS	6

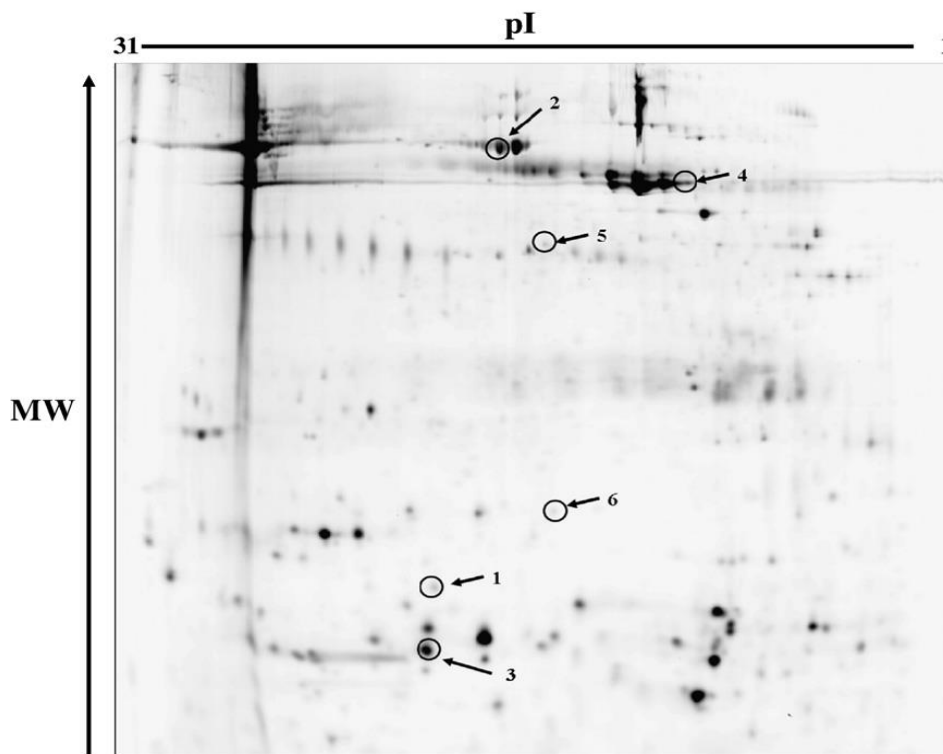


Figure 10: Profil électrophorétique des protéines salivaires analysées par 2D DIGE (pHi 3–11). Les 6 protéines indiquées présentent des différences d'expression significatives entre les échantillons étudiés.

- Un pic de base de la Protéine de liaison au calcium S100a été déterminé par LC-MS-MS (Figure11). L'identification des peptides de digestion a été faite par l'algorithme Turbo-SEQUEST du logiciel BioWork 3.1 (Thermo Electron) et la base de données (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland).

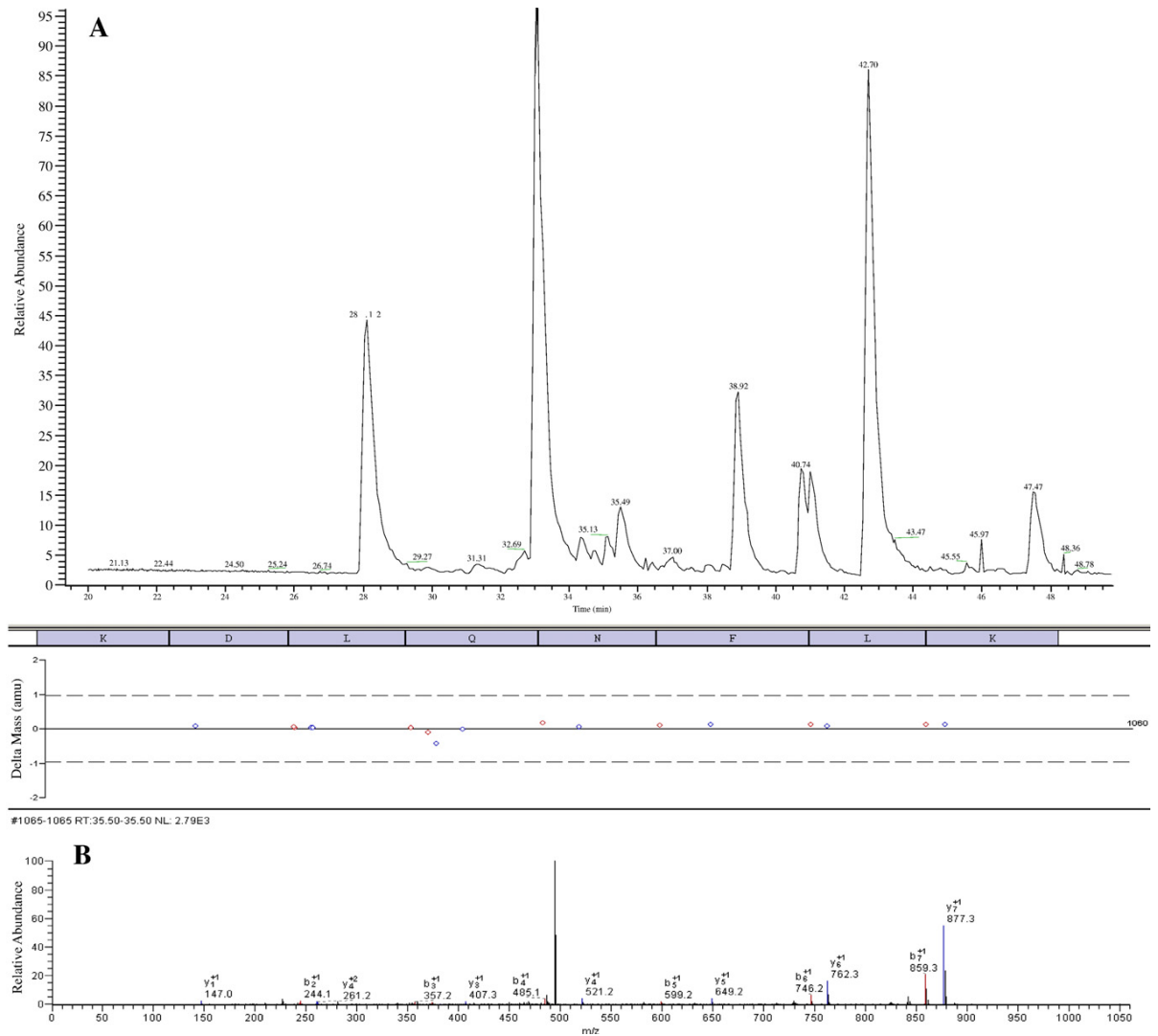


Figure 11: (A) pic de base du chromatogramme (ms) géré par LC–MS–MS de digestats de la protéine de liaison au calcium S100. (B) ion continu de séries b ou y- d’au moins six résidus du peptide KDLQNFLK de la S100 calcium binding protein.

L'abondance accrue de la protéine de liaison au calcium S100 a été confirmée par immunoblotting. Une analyse par Western blot a été effectuée sur les 16 échantillons avec les chiffres représentatifs (figure 11) qui montrent les résultats pour 8 des échantillons individuels (4 échantillons HNSCC contre 4 échantillons témoins). Les résultats confirment l'augmentation des niveaux d'abondance de la protéine de liaison au calcium S100 dans les échantillons HNSCC par rapport au groupe témoin.

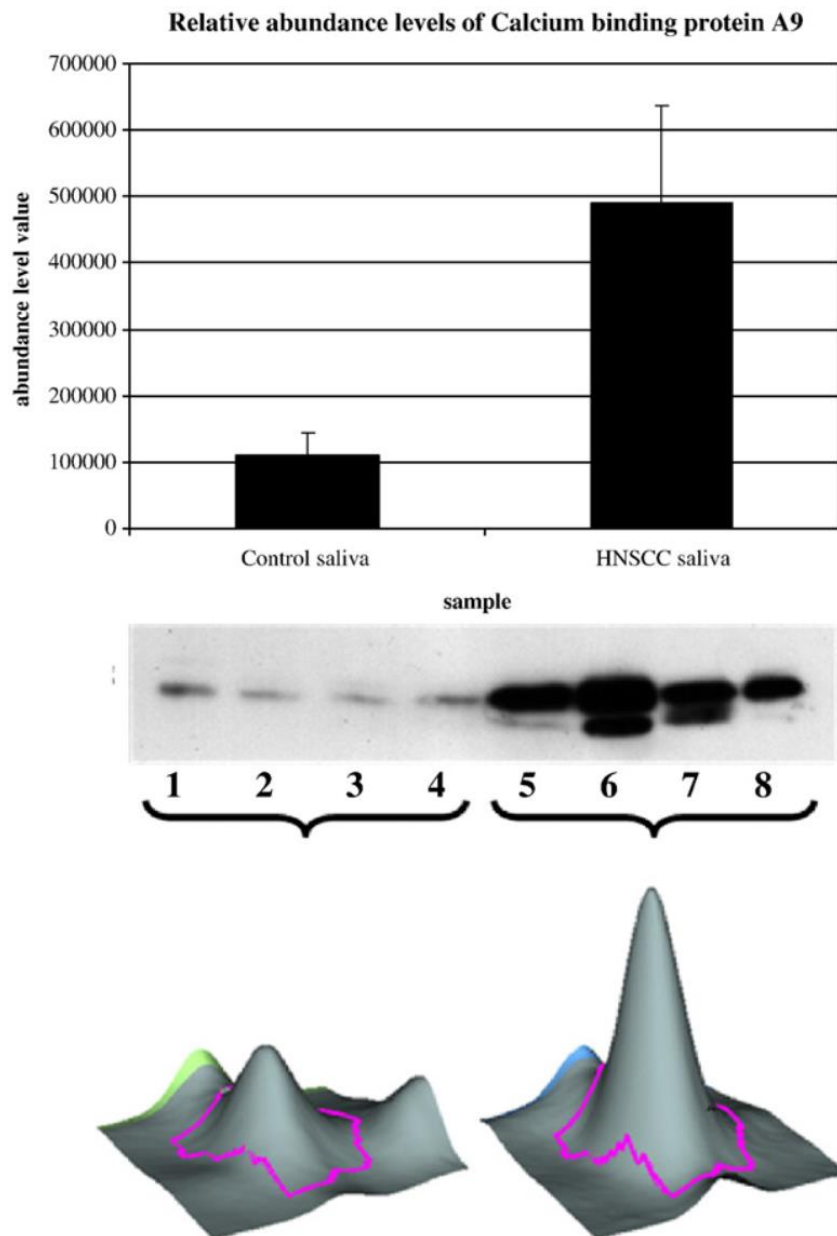


Figure 12: Western blot et analyse statistique de la salive des échantillons de contrôle et HNSCC en utilisant un anticorps dirigé contre le MRP14 (protéine de liaison au calcium S100).

Conclusion: Beaucoup de ces protéines sont impliquées dans la progression tumorale, les métastases et l'angiogénèse. La proximité de la salive avec la tumeur en développement est sans aucun doute un facteur majeur pour faciliter la détection de ces protéines et une telle stratégie peut conduire à développement d'un panel de biomarqueurs utiles pour la détection précoce du HNSCC (Lichieh et al. 2018). Ces résultats ont indiqués qu'un test salivaire rapide non invasif et peu coûteux pourrait être établi pour la détection des groupes à haut risque de développer un HNSCC et

le suivi de la réponse à des régimes thérapeutiques spécifiques est certainement réalisable.

5. Article de Wu et al. 2015

Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma

Introduction: Le carcinome épidermoïde de la cavité buccale (OSCC: oral cavity squamous cell carcinoma) est fréquemment associé à un mauvais pronostic est une des principales causes de décès liés au cancer dans le monde. La découverte des biomarqueurs accessibles aux fluides corporels est nécessaire pour améliorer le dépistage de l'OSCC. Dans cette étude, nous avons cherché à découvrir des biomarqueurs OSCC salivaires par profilage comparatif des protéomes salivaires des bénévoles, des personnes atteintes de troubles buccaux potentiellement malins (OPMD) et les patients de l'OSCC en utilisant SDS-PAGE couplé avec LC-MS / MS.

Méthode: Dans cette étude, on a utilisé des échantillons salivaires de volontaires sains, des personnes atteintes de l'OPMD, pour les comparer à la salive des patients de l'OSCC, pour la recherche de biomarqueurs de l'OSCC. Les échantillons de la salive totale non stimulée a été obtenu des donneurs ayant une bonne hygiène buccale au moins 1h avant la collecte. Les protéines salivaires ont été séparées par SDS-PAGE, digérées par la trypsine puis analysées par chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC - MS/MS). Les spectres de masse obtenus sont analysés par Mascot contre la base de données Swiss-Prot. Le logiciel Scaffold a été utilisé pour la recherche de novo des séquences protéiques en utilisant Peptide Prophet and protein Prophet. L'étude des voies de signalisation a été faite par le programme DAVID contre la base de données KEGG. L'étude des interactions protéine-protéine a été réalisée en ligne par STRING online software. Le test ELISA a été utilisé pour déterminer les niveaux d'expression des protéines candidates biomarqueurs entre les groupes de l'étude. L'analyse statistique a été faite par SPSS.

Résultats: Vingt-deux protéines salivaires surexprimées ont été identifiées dans le groupe OSCC par rapport aux témoins (OPMD et contrôles). Afin d'estimer la reproductibilité de l'analyse protéomique, les protéines salivaires identifiées dans trois répliques sont été analysées pour les éléments qui se chevauchent.

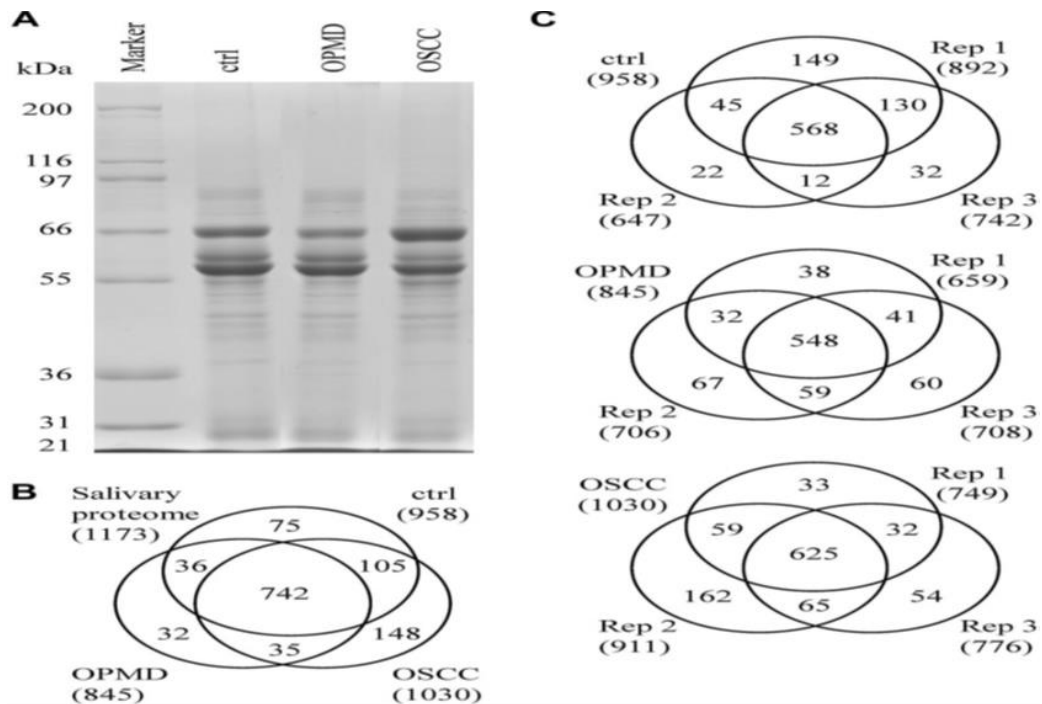


Figure 13: Profilage protéomique des échantillons de salive prélevés les volontaires sains, les personnes de l'OPMD et les patients de l'OSCC.

(A) Échantillons de salive provenant des contrôles sains (ctrl) Les personnes OPMD (OPMD) et les patients OSCC (OSCC) ont été collectées et traitées comme décrit dans les matériaux et méthodes.

Les protéines (30 g par voie) ont été séparées par 10% de SDS PAGE et teinté de bleu de Coomassie.

(B) Les diagrammes de Venn montrent chevauchements entre les protéines salivaires identifiées dans le ctrl, le OPMD et les groupes OSCC. (C) Les diagrammes de Venn affichent des chevauchements entre les protéines identifiées dans les trois répliques.

- Les diagrammes de Venn montrent chevauchements entre les protéines salivaires identifiées dans les échantillons contrôle, le OPMD et les groupes OSCC figure 13B, et aussi des chevauchements entre les protéines identifiées dans les trois répliques figure 13C.

-L'abondance des protéines salivaires pourrait discriminer l'OSCC groupe des volontaires sains et du groupe OPMD.

-Les protéines exprimées de manière différentielle dans le groupe OSCC étaient fortement corrélées en chœur avec des processus biologiques; Métabolisme des polysaccharides, maturation des protéines, réponses de la défense, inflammation et immunité, réponse aux blessures et homéostasie chimique.

-Les protéines salivaires différentiellement exprimées dans les groupe OSCC par rapport au groupe témoin ou au groupe OPMD.

-Les niveaux salivaires de la résistine (RETN) ont été significativement augmentés chez les patients OSCC par rapport aux témoins sains figure 14B.

-Des niveaux élevés de RETN salivaire chez les patients OSCC étaient fortement corrélé avec les tumeurs primaires à un stade avancé, stade global et métastases ganglionnaires figure 14C.

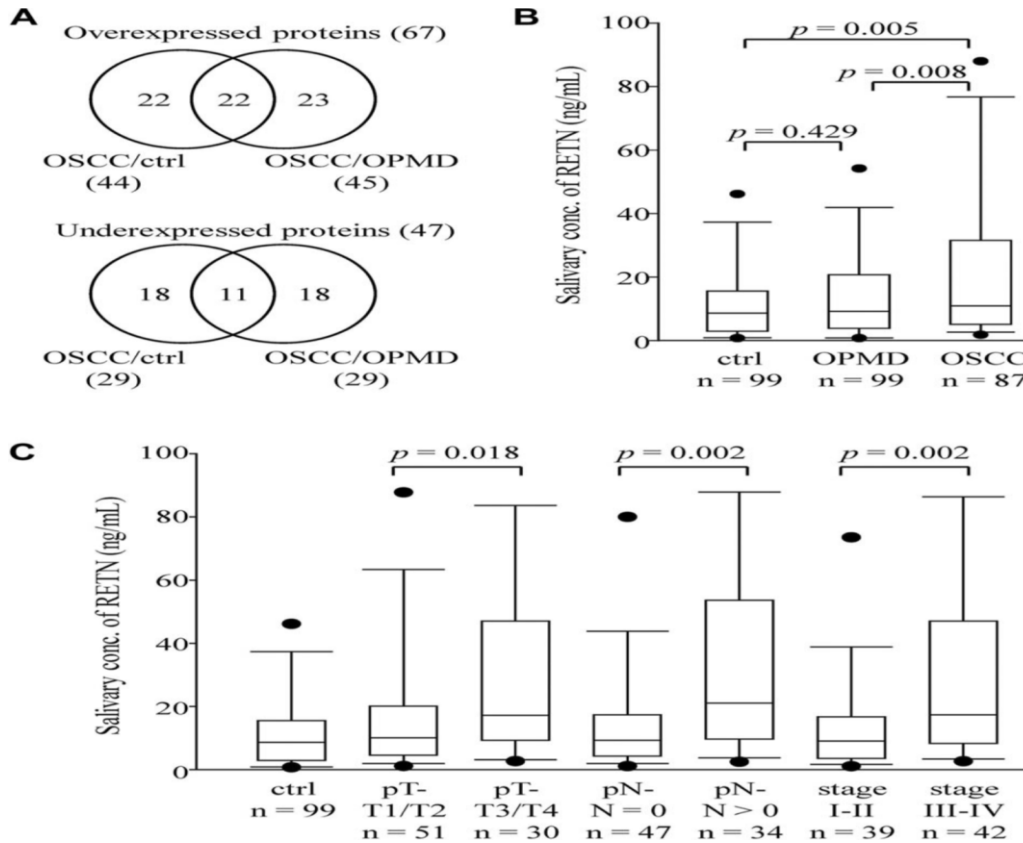


Figure 14: Niveaux salivaires de RETN chez les patients OSCC.

Conclusion: Le profilage des protéines salivaires est combiné avec la bioinformatique pour extraire des données afin de prioriser les candidats qui méritent plus de pré-évaluation. Parmi les marqueurs candidats identifiés, le RETN s'est révélée efficace pour détecter l'OSCC, et le niveau élevé de RETN salivaire était étroitement associé au mauvais pronostic de l'OSCC.

6. Article de Saibaba et al. 2016

Proteomic analysis of human saliva: An approach to find the marker protein for ovulation

Introduction: L'ovulation est un processus biologique dans lequel l'ovaire mature où il s'effectue une rupture folliculaire de manière à décharger l'ovule, et cela se produit sous l'influence de la montée de l'hormone lutéinisante (LH). Le pic de LH déclenche une série de processus protéolytiques qui contrôlent l'ovulation. La salive contient un certain nombre d'hormones. Dans cette étude, nous avons étudié le profil des protéines salivaires au cours des différentes phases du cycle menstruel pour identifier les protéines qui sont spécifiquement présentes pendant la phase d'ovulation.

Méthodes: Des échantillons salivaires de volontaires féminines en bonne santé indemnes de maladies aiguës ou chroniques et de dysfonctionnement ovariens ont été utilisés, après une analyse hormonale des échantillons de salive obtenus au cours des trois phases du cycle menstruel. Selon les concentrations d'œstradiol, le statut du follicule ovarien a été évalué avec échographie pour valider le jour de l'ovulation. Ensuite une précipitation des protéines a été faite par l'acide trichloroacétique et l'acétone avant de réaliser une SDS-PAGE. Les échantillons de protéines digérés par la trypsine ont été analysés par spectrométrie de masse et western blot. Une annotation fonctionnelle des protéines a été faite par STRAP 1.5 online database et une mesure de l'activité antimicrobienne de la salive a été entreprise. Les analyses statistiques ont été réalisées par Statistical Package for Social Sciences for Windows, version 16.0.

Résultats

- Les concentrations d'œstradiol sont plus élevées pendant la phase ovulatoire (figure 15).

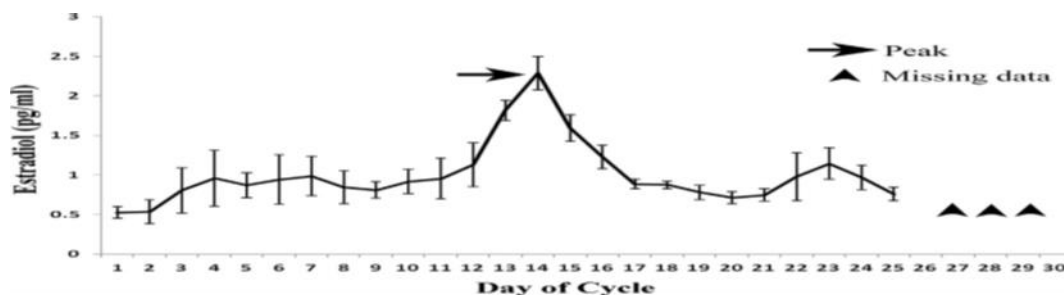


Figure 15: Niveaux d'œstradiol salivaire pendant le cycle menstruel. Le schéma quotidien de l'œstradiol niveau a été enregistré dans l'échantillon de salive du sujet. Le niveau d'œstradiol atteint le pic autour des jours 13 ou 14 du cycle menstruel.

- La concentration totale en protéines de la salive s'est avérée être significativement plus élevée pendant la phase ovulatoire que la phase pré- et post-ovulatoire tableau 3.

Tableau 2: Concentrations de protéines salivaires au cours des différentes phases du cycle menstruel.

Détails	Pré-Ovulation	Ovulation	Post-Ovulation
Concentration en protéines (mg / mL)	1.14 0.39	2.49 0.39*	1.50 0.28**

Les valeurs sont exprimées en moyenne SD. La différence moyenne est significative à $p < 0,05$.

* $p < 0,05$, pré-ovulation v Ovulation.

* $p < 0,05$, Ovulation v Post-ovulation.

* $p < 0,05$, pré-ovulation v Post-ovulation.

- La concentration des échantillons de protéines salivaires dans les différentes voies étaient les mêmes, PreO-Phase de pré-ovulation, O - Phase d'ovulation et PostO - Phase de post-ovulation.

- La bande de 14,5 kDa a été fortement exprimée au cours de la phase ovulatoire par rapport aux autres phases figure 16.

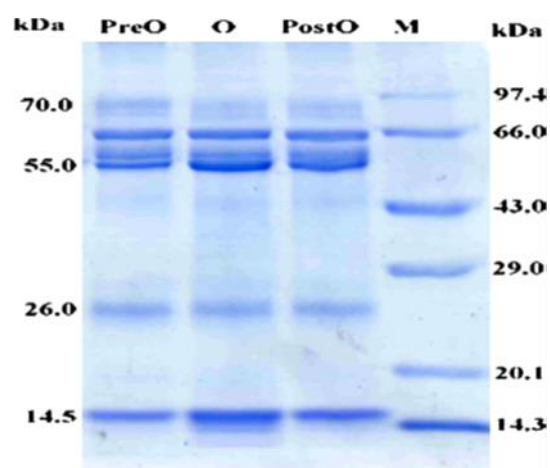


Figure 16: SDS-PAGE des protéines salivaires entières.

- L'abondance de protéines dans la bande de 14,5 kDa pendant la phase ovulatoire était élevée par

rapport aux deux autres phases du cycle menstruel (figure 16).

- La cystatine-S a été fortement exprimée pendant la phase ovulatoire par rapport aux autres phases.

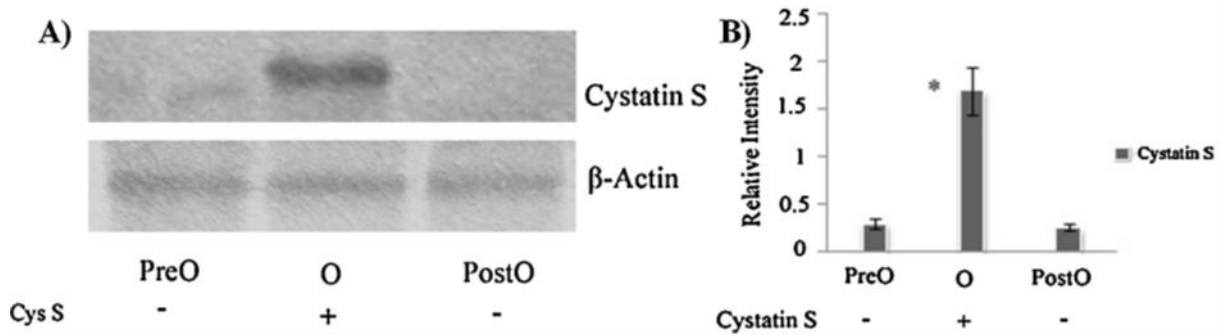


Figure 17: Analyse Western blot de la protéine salivaire. A) Western blot de Cystatin-S dans la salive au cours des différentes phases du cycle menstruel. B) Le diagramme à barres représente la relative abondance de Cystatine-S au cours des trois phases, du cycle menstruel normalisé avec l'expression du gène ménager b-actine.

- La salive de la phase d'ovulation présente une activité antibactérienne maximale (figure 18).

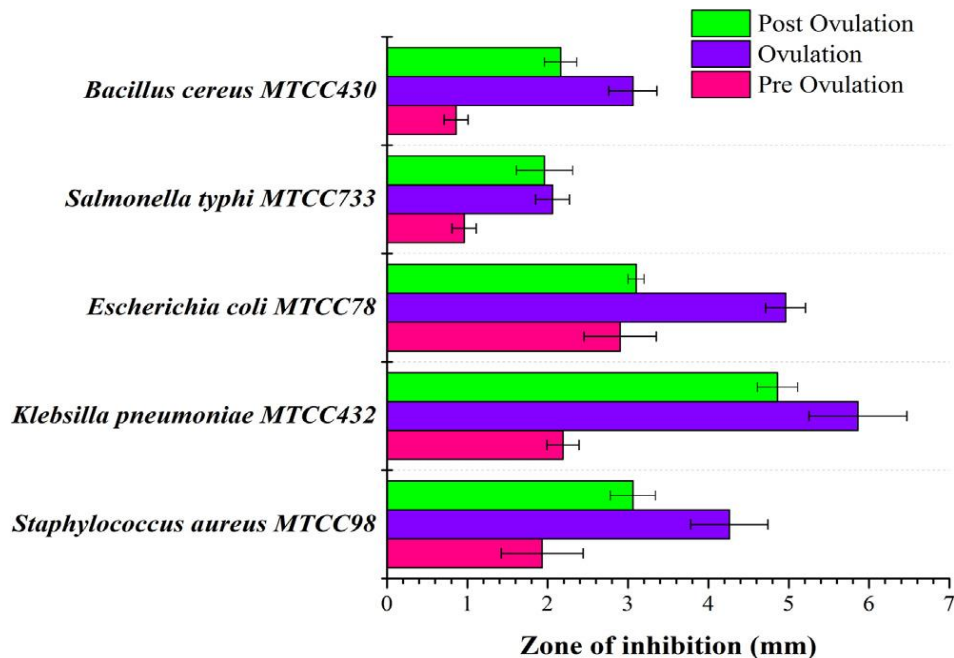


Figure 18: Activité antimicrobienne de la salive pendant les trois phases du cycle menstruel.

Conclusion: Depuis la recherche intensive contemporaine pour les biomarqueurs non invasifs pour différentes applications, la découverte de cette étude, bien que préliminaire, peut aller très loin en faisant apparaître un biomarqueur non invasif pour l'ovulation.



Discussion et synthèse générale

Ces études font le suivi de variations de protéines salivaires comme de véritables marqueurs de certaines maladies. Ainsi, l'utilisation de la salive comme moyen de développement et d'évaluation des biomarqueurs allège l'inconfort des sujets/patients en fournissant une méthode non invasive de détection des maladies. En effet, des études ont déjà montré que des protéines de la salive peuvent être utilisées pour détecter des maladies telles que la maladie cancéreuse de foie et carcinome épidermoïde de la tête et du cou, diabèteect.

La salive humaine est intéressante pour le diagnostic des maladies car sa collecte est moins invasive que celle du sang pour les analyses sérum / plasma. Dans ce contexte, nous allons analyser et discuter quelques études ayant pour but la recherche de biomarqueurs salivaires de pathologies les plus étudiées par le biais de l'analyse protéomique.

Une recherche primaire a identifié 131 articles: 82 sont « articles de recherche » et 49 sont « articles de synthèse ». Après la sélection, 72 articles remplissaient les critères d'inclusion ont été retenus, ainsi 6 articles ont été sélectionnés pour l'analyse finale. Les études sélectionnées ont été séparées en 4 catégories en fonction de la pathologie étudiée:

1. Les biomarqueurs tumoraux

Dans l'étude de **Dowling et al. (2008)**, on a montré que le développement de nouveaux diagnostics protéomiques demeure essentiel pour la détection précoce et la surveillance du carcinome épidermoïde de la tête et du cou et aussi les quantifications des niveaux protéines salivaires dans HNSCC par rapport à un groupe témoin dans le but de détecter des différences dans les niveaux de protéines qui pourraient servir de marqueurs pour la maladie. Les marqueurs trouvés dans la salive sont susceptibles d'être relativement sélectifs pour le HNSCC. De nombreux biomarqueurs actuels sont associés à plusieurs cancers, ce qui rend difficile un diagnostic précis. Aussi, ils permettent d'identifier que ce test est rapide, peu coûteux et peu invasif pour les groupes à haut risque de développer un HNSCC et pour le suivi de la réponse à des régimes thérapeutiques spécifiques est certainement réalisable.

D'autre part, l'étude de **Ding et al. (2019)** montre que l'analyse protéomique salivaire a été largement employée dans un large éventail de cancer, mais pas dans le carcinome hépatocellulaire. Ainsi le but est d'identifier et de révéler un biomarqueur salivaire potentiel pour le dépistage de cancer de foie. La protéomique quantitative basée sur iTRAQ a indiqué que la SOD2 pourrait servir de biomarqueur salivaire potentiel pour la détection de cancer de foie.

L'étude de **Wu et al. (2015)** a montré que les niveaux salivaires de RETN ont été significativement augmentés chez les patients OSCC par rapport aux témoins sains. Surtout, des niveaux élevés de

RETN salivaire chez les patients OSCC étaient fortement corrélé avec les tumeurs primaires à un stade avancé, stade global et métastases ganglionnaires. Comme la salive peut être facilement recueilli dans la pratique clinique, cette étude suggère que RETN salivaire détient le potentiel d'être un biomarqueur de dépistage de l'OSCC. En outre RETN, la thrombospondine-2 salivaire (THBS2) et auto-anticorps salivaires (auto-Abs) ont également été identifiés pour être efficaces pour distinguer les patients OSCC et les individus en bonne santé.

2. Les biomarqueurs de la dystrophie musculaire de Duchenne

Dans l'étude de **Murphy et al. (2019)**, les dystrophinopathies sont des troubles multi systémiques qui affectent la musculature squelettique, le système cardio-respiratoire et le système nerveux central. La récente étude protéomique du modèle de dystrophinopathie chez la souris mdx-4cv a confirmé que l'isoforme de la dystrophie DP427-M et les peptidases klk1-b1 sont des protéines les plus réduites dans les muscles dystrophiques. Le taux élevé de klk1 dans la salive de souris mdx-4cv (30kDa) est due à l'augmentation de l'expression des gènes codant pour la klk1 et les peptidases associées à klk1 (b1, b2.....).

D'après aussi **Murphy et al. (2019)**, les niveaux élevés des peptidases apparentés à la klk1 sont dus à l'altération de la signalisation cellulaire au niveau de système klk-kinine et la régulation de l'homéostasie tissulaire, ainsi qu'un remodelage de la matrice extracellulaire et une modification de la réponse immunitaire dans la dystrophie musculaire liée au sexe. Le changement des protéines dérivées dans les muscles est lié à la dégénérescence de fibres et au stress cellulaire. Cela comprend les protéines ou les fragments des protéines et les principales classes d'organites dans le protéome de biofluide.

3. Les biomarqueurs salivaires de diabète de type 1 chez les enfants

Lima et al. (2010) ont confirmé que la salive est le meilleur fluide biologique pour la surveillance de la glycémie, elle présente une alternative aux échantillons de sang et l'analyse de la salive peut fournir des informations sur les processus biologiques des patients diabétiques et révéler des complications précoces avant l'apparition des symptômes cliniques de la maladie.

Giannobile et al. (2009) ont confirmé que la salive entière est une combinaison des sécrétions des glandes salivaires majeures et mineures, ensemble avec le liquide gingival (présence des inflammations buccales), tandis que **Ayuthaya et al. (2018)** ont rapporté que les protéines exprimées dans la salive sont des interleukines et des cytokines inflammatoires spécialement à des maladies buccales qui sont des complications de diabète de type 1.

Cabras et al. (2010) ont identifié que les modifications des protéines salivaires observées chez les patients de diabète de type 1 indiquant une régulation négative des peptides impliqués dans la défense de l'hôte de la cavité buccale.

Zipris (2010) a trouvé que les récepteurs de type péage (TLR), une autre voie de signalisation qui s'est avérée dérégulée chez des patients mal contrôlés, sont des protéines qui jouent un rôle clé dans le système immunitaire inné. Ces récepteurs immunitaires sont capables de reconnaître les molécules microbiennes, de détecter les infections et d'initier des réponses antimicrobiennes de défense de l'hôte. Selon de nouvelles données, le diabète auto-immun serait déclenché par les voies immunitaires innées et les TRL sont les médiateurs de ce mécanisme.

Comme démontré précédemment sur des souris diabétiques, une activité accrue des récepteurs de la sérotonine induit une contraction des artères provoquant ainsi un dysfonctionnement vasculaire (**Nelson et al. 2012**). La découverte qu'un antagoniste des récepteurs de la sérotonine inverse efficacement notre phénotype expérimental conduit à suggérer que ce phénotype est au moins partiellement induit par une activité accrue des récepteurs de la sérotonine. Ce qui précède confirme la constatation susmentionnée de dysfonctionnement vasculaire chez les diabétiques ayant une mauvaise glycémie diabétiques témoins ou bien contrôlés. En outre, cette découverte suggère que les antagonistes des récepteurs de la sérotonine pourraient être potentiellement utilisés comme intervention préventive chez les jeunes patients avec un mauvais contrôle diabétique. Cette possibilité d'intervention est renforcée par le fait que les antagonistes de la sérotonine améliorent la fonction vasculaire chez les patients atteints d'une maladie artérielle périphérique (**Miyazaki et al. 2007**).

4. Les biomarqueurs de la phase d'ovulation

Le rôle des marqueurs biologiques est le dépistage précoce, la surveillance des différentes maladies, ainsi que le suivi de phénomènes physiologiques. La salive humaine est intéressante car sa collecte est moins invasive que celle du sang pour les analyses sérum / plasma.

L'étude de **Saibaba et al. (2016)**, a montré que la phase ovulatoire du cycle menstruel a une certaine influence sur la teneur en protéines de salive. Dont la cystatine-S a été identifiée comme la protéine hautement exprimée pendant cette phase et donc utilisée comme un biomarqueur non invasif pour le suivi de l'ovulation.

| *Conclusion*

Les avantages de la salive en tant que fluide diagnostique sont nombreux: collecte rapide et non invasive, pratique à stocker, et collecter de manière non invasive. Il est par ailleurs, de plus en plus étudié par la communauté scientifique. Le nombre croissant de biomarqueurs découverts, associés à l'analyse avec des technologies de plus en plus performantes, nous permet de dire que la salive est un substitut du sang très intéressant pour la recherche de biomarqueurs.

L'objectif de ce travail est de souligner l'intérêt de l'analyse protéomique avec ses différentes approches dans la recherche et l'identification de biomarqueurs salivaires de différentes pathologies. Ceci est permis par l'analyse de quelques articles traitant ce contexte.

Ce travail a permis de découvrir le monde de la recherche des biomarqueurs salivaires en lien avec la santé générale (dépistage, diagnostic, suivi...). Par exemple, l'étude de **Ding et al. (2019)** a montré l'intérêt de la protéomique quantitative qui, basée sur la technique de iTRAQ, permet d'identifier et de quantifier des protéines *in vitro* de suggérer la SOD₂ comme biomarqueur salivaire potentiel pour la détection du cancer du foie et aussi l'étude de **Murphy et al. (2019)**, en faisant une étude sur la dystrophie musculaire de Duchenne, a signalé le taux élevé de la klk1 salivaire chez les malades.

La présence des biomarqueurs et leurs quantifications dans la salive représentent un outil formidable pour évaluer des profils de risque, diagnostiquer une maladie ou permettre une stratégie et une surveillance thérapeutique adaptée.

La meilleure compréhension des corrélations entre la salive et la santé générale commence à porter ses fruits, ce qui favorisera de plus en plus d'applications médicales facilitant le diagnostic et l'individualisation d'une thérapie ciblée précise, pratique et sans douleur.

Références

Bibliographiques

A

Ayuthaya B I N., Everts V., and Pavasant P. 2018. The immunopathogenic and immunomodulatory effects of interleukin-12 in periodontal disease. *European journal of oral sciences*, 126(2): 75-83.

B

Basir L., Aminzade M., Javid A Z., Khanehmasiedi M et Rezaeifar K. 2017. Oral health and characteristics of saliva in diabetic and healthy children. *Australasian medical journal (AMJ)*, 10(10): 884-889.

Bendrihem R et Vacher C B. 2012. Anatomie des glandes salivaires principales. Application à la chirurgie de la glande sublinguale. *Edition Diffusion Presse Sciences*, 257: 41-47.

Bennick A N D E R S. 1975. Chemical and physical characteristics of a phosphoprotein from human parotid saliva. *Biochem*, 145: 557-567.

Bernard V-B. 2009. Biomarqueurs en imagerie. *Service de Radiologie Hôpital Beaujon Insermu 773 Université Paris Diderot*, 34: 663-667.

Bruno R. 2015. Biomarqueurs en pratique quotidienne: utiles et futiles. *Le Congrès Médecins. Conférence d'Essentiel*, 15.

C

Cabras T., Pisano E., Mastinu A., Denotti G., Pusceddu P P., Inzitari R., et al. 2010. Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type 1 diabetes. *Mol. Cell. Proteomics*, 9: 2099-2108.

Castro R J., Herrera R et Giacaman R A. 2016. Salivary protein characteristics from saliva of carious lesion-free and high caries adults. *Researchgate*, 29 (2): 178-185.

Charpentier S. 2011. Les biomarqueurs. *Pôle de Médecine d'Urgences, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse*: 17-319.

Chattopadhyay I et Panda M. 2019. Recent trends of saliva omics biomarkers of the diagnosis and treatment of oral cancer. *Journal of oral biosciences*, 61(2): 84-94.

Chenevier-Gobeaux C., Billefont M., Eche A., Trabattoni E., Kierzek G., Pourriat J L et Claessens Y E. 2010. Nouveaux biomarqueurs de la pathologie cardiovasculaire et infectieuse en médecine d'urgence. *Reanimation*, 10 (004): 648-654.

Couquet M P. 2017. Identification de marqueurs biologiques dans l'urine et la salive de patients atteints de Trypanosomose Humaine Africaine. Thèse d'exercice, université de Limoges.

D

Dallell R et Devoize L. 2011. Salivation. *EMC. Chirurgie orale et maxillo-faciale*: 1-18.

Dame Z T., Aziat F., Mandal R., Krishnamurthy R., Bouatra S., Borzouie S et Liu P. 2015. The human saliva metabolome. *Metabolomics*, 11(6): 1864-1883.

Devoize L et Dallel R. 2010. Salivation. *Médecine buccale*, 28-150:10.

Diamandis E P. 2010. Cancer biomarkers: can we turn recent failures into success?. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(19): 1462-1467.

Ding F., Sun K., Sun N., Jiang Q., Cao M et Wu Z. 2019. iTRAQ-based proteomics reveals SOD2 as a potential salivary biomarker in liver cancer. *The International Journal of Biological Markers*, 34(3): 221-231.

Dowling P., Wormaldb R., Meleadya P., Henrya M., CurranbA et Clynesa M. 2008. Analysis of the saliva proteome from patients with headand neck squamous cell carcinoma reveals. *Journal of Proteomics*, 71(2): 168-175.

G

Ganong W. 2005. Physiologie médicale. Les glandes salivaires et la salive. *Edition de Boeck*, P 849.

Gasperment S. 2018. La salive et ses biomarqueurs : implications physiopathologiques et médicales, Thèse en chirurgie dentaire, *Université de Saint-pierre*: 27-30.

Giannobile W V., Beikler T., Kinney J S., Ramseier C A., Morelli T and Wong D T. 2009. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol 2000*, 50: 52-64.

Gondret F., Hedeman M S., Messad F., Vershuren L., Wang J., de la Fuente G et Jansman A. 2020. Identification de biomarqueurs de l'efficacité alimentaire chez le porc en croissance. *Researchgate (Journées Recherche Porcine)*, 52: 19-24.

González M., de Oca L M et Jiménez G. 2001. Cambios en la composición de la saliva de pacientes gestantes y no gestantes. *PerinatolReprod Hum*, 15: 195-201.

Gosho M., NagashimaK et Sato Y. 2012. Study desings and statistical analyses for biomarker Research. *Sensors (Basel)*, 12 (7): 8966-8986.

H

Hayat J O., Gabieta-Somnez S., Yazaki E., Kang J Y., Woodcock A., Dettmar P et Sifrim D. Pepsin in saliva for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease. 2014. *Researchgate*, 1-8.

Helmerhorst E J., Oppenheim F G et Denres J. 2007. Saliva: a Dynamic Proteome. *Critical reviews in oral biology and medicine*, 86: 680.

Hirtz C., Chevalier F., Raingeard I., Egea J C., Bringer J., Rossignol M et Dominique Deville de Pèrière. 2005. Recherche préliminaire de marqueurs salivaires du diabète de type 1 chez l'homme. *Research Gate*: 18-19.

Humphrey S P et Williamson R T. 2001. A review of saliva. Normal composition, *flow, and function*. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2): 162-169.

k

Kaufman E et Lamster I B. 2002. The diagnostic applications of saliva. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(2): 197-212.

L

Lecor P A., Dia-Tine S., Gaye P M., Sall O H., Dieng-Sarr F Y., Koma G et Diallo B. 2013. Evaluation quantitative de la sécrétion et de pouvoir tampon de la salive au cour de la radiothérapie des cancers des voies aéro-digestives supérieurs au Sénégal. *Med Buccale Chir Buccale*, 19: 227-233.

Li Q., Ouyang X., Chen J., Zhang P et Feng Y. 2020. A Review on salivary proteomics for oral cancer screening. *Caister.com/cimb*, 37: 47-56.

Lichieh J C., Yung-Chin H., Wei-Fan C., Chia-Jung T., Shih-Yu L., Kai-Ping C., Chih-Yen C., Jau-Song Y. 2018. Use of saliva protein biomarkers for diagnosis of oral cavity cancer. *International Journal of Head and Neck Science*, 2(2): 56-68.

Lima D P., Diniz D G., Moimaz S A ., Sumida D H ., and Okamoto A C. 2010. Saliva: reflection of the body. *Int.J. Infect. Dis*, 14: 184-188.

Longrois D et Provenchère S. 2017. Utilisation des biomarqueurs dans le contexte périopératoire. *Anesthésie Réanimation*, 3(4): 376-385.

M

Miyazaki M., Higashi Y., Goto C., Chayama K., Yoshizumi M., Sanada H., et al. 2007. Sarpogrelate hydrochloride, a selective 5-HT_{2A} antagonist, improves vascular function in patients with peripheral arterial disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 49: 221-227.

Murphy S., Zweyerb M., Rustam R., Swandullab D et Ohlendiecka K. 2019. Proteomic identification of elevated saliva kallikrein levels in the *mdx-4cv* mouse model of Duchenn muscular dystrophy. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 18(100541).

N

Nagihan B., Nathalie S., Witold W., Jonas G ., Kai B., Asa W., Christian T., Ralph S., Veli O zgen O ztu`rk ., Beral A., Gulnur E., and Georgios N., Belibasakis. 2020. Targeted proteomics guided by label-free quantitative proteome analysis in saliva reveal transition signatures from health to periodontal disease. *Research*: 1392-1409.

Nelson P M., Harrod J S., and Lamping K G. 2012. 5HT (2A) and 5HT (2B) receptors contribute to serotonin-induced vascular dysfunction in diabetes. *Exp. Diabetes Res*: 398-406.

Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S et Feron G. 2012. Variability of human saliva

composition possible relationships with fat perception and liking. *Sciverse science direct*, 57: 556-566.

Nicholas J., Ashton., Mark Ide., Zetterberg H et KajBlennow. 2019. Salivary biomarkers for alzheimer's disease and related disorders. *King's Research Portal*: 83-94.

O

Ohshiro K., Rosenthal D I., Koomen J M., Streckfus C F., Chambers M., Kobayashi R et El-Naggar A K . 2007. Pre-analytic saliva processing affect proteomic results and biomarker screening of head and neck squamous carcinoma. *International Journal of Oncology*, 30: 743-749.

P

Pappa E .,Vastardis H., Mermelekas G ., Gerasimidi-Vazeou A., Zoidakis J et Vougas K. 2018. Saliva proteomics analysis offers insights on type 1 diabetes pathology in a pediatric. Population. *Frontiers in Physiology*, 9: 444.

Pepe M S., Etzioni R., Feng Z., Potter J D., Thompson M L., Thornquis M etYasui Y. 2001, Phases of biomarker development for early detection of cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 93 (14).

Podrigalo L V., Iermakov S S., Galashko N I., Galashko M N et Dzhym V Y. 2015. Assessment of arm wrestlers adaptation status on the base of saliva biochemical characteristics in dynamic of competition and training loads. *Journal of Physical Education and Sport (JPES)*, 15(4): 849-856.

R

Rehan F., Khan R S., Memon M S., Naqvi S., Khan R S et Sultan Z K. 2016. Analysis of resting mouth salivary flow rate and salivary pH of tobacco chewers and smokers. *J Pak Dent Assoc*, 4: 159-63.

S

Saibaba G., Rajesh D., Muthukumar S., Sathiyarayanan G., Padmanabhane P., Akbarsha M-A., Gulyás B et Archunan G. 2016. Proteomic analysis of human saliva: An approach to find the marker protein for ovulation. *Reproductive Biology*, 16: 287-294.

Scannapieco F A. 1994. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 5(3): 203-248.

Schenkels L C., Veerman E Cet Nieuw Amerongen A V. 1995. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6(2): 161-175.

Sculley D V et Langley-Evans S C. 2003. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clinical Science*, 105: 167-172.

V

Verstraete A G et Samyn N. 2003. Le dépistage biologique d'une conduite sous influence. *Annales de Toxicologie Analytique*, 107(2): 84-85.

Verstraete A., et Labat L. 2009. Utilisation des tests rapides de détection de drogues dans la salive au bord de la route et en santé au travail. *Analyse de Toxicologie Analytique*, 21(1): 3-8.

W

Wu C C., Chu H W., Hsu C W., Chang K P et Liu H P. 2015. Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma. *Proteomics-journal*, 15: 3394-3404.

Z

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

Zipris D. 2010. Toll-like receptors and type 1 diabetes. *Adv. Exp. Medicine Biological*, 654: 585-610.

Biomarqueurs de la salive et santé générale

Résumé

La salive est un fluide biologique sécrété en quantité abondante et de façon relativement régulière. Depuis plusieurs années se sont développés des projets couplant les techniques de protéomique et de transcriptomique et visant à constituer un véritable catalogue des protéines salivaires humaines. Notre travail vise à montrer l'importance d'identification de biomarqueurs salivaires de maladies par l'approche protéomique via une analyse des résultats obtenus de nombreuses études antérieures. Les résultats des études ont révélé que la K1K1 peut être considéré comme candidat biomarqueur potentiel pour le diagnostic de la dystrophie musculaire des souris mdx-4cv. Ainsi, la technique iTRAQ met en évidence l'intérêt de la salive dans la pathologie du diabète et révèle que la SOD2 peut détecter le cancer du foie. De plus, l'analyse 2D DIGE, l'imagerie sur gel et l'identification par LC MS/MS des protéines candidates sont des essais qui pourront être établis pour la détection de carcinome hépatocellulaire et HNSCC. D'un autre côté, la surexpression de la RETN salivaire est associée au mauvais pronostic de l'OSCC. L'identification et le développement de nouveaux biomarqueurs salivaires des maladies entrepris depuis quelques années devraient permettre une identification de manière plus précoce, plus spécifique et plus sensible de différentes pathologies.

Mots-clés: Salive, protéomique, biomarqueurs, pathologies, diagnostic.

Abstract

Saliva is a biological fluid secreted in abundant quantities and on a relatively regular basis. For several years, projects have developed, tying proteomics and transcriptomic techniques and aiming to create a veritable catalogue of human salivary proteins. Our work aimed to show the importance of salivary biomarkers for diseases via analysis of the results obtained from many previous studies. The results of the studies revealed that K1K1n is a potential biomarker candidate for the diagnosis of muscle dystrophy of mdx-4cv mice. The iTRAQ technique highlights the potential of salivary diagnoses in diabetes pathology. It indicated that SOD2 could be used for the detection of liver cancer. In addition, DIGE 2D analysis, gel imaging and subsequent LC MS/MS identification of candidate proteins could be established for the detection of hepatocellular carcinoma. The high level of RETN in saliva is associated with bad prognosis of OSCC. Finally, the identification of new salivary biomarkers of diseases undertaken in recent years should enable earlier, more specific and more sensitive identification of different pathologies.

Key words: Saliva, proteomics, biomarkers, pathologies, diagnosis.

ملخص

اللغاب هو سائل بيولوجي يفرز بكميات وفيرة وبشكل منتظم نسبيا. تم خلال السنوات الاخيرة تطوير المشاريع التي تجمع بين تقنيات البروتينات والنسخ والتي تهدف إلى تكوين فهرس حقيقي للبروتينات اللغابية البشرية. الهدف من عملنا هو إظهار أهمية تحديد المؤشرات الحيوية اللغابية للأمراض من خلال النهج البروتيومي. كشفت نتائج الدراسات أن K1K1n يعتبر كمؤشر حيوي لتشخيص فشل العضلات عند الفئران mdx-4cv من جانب اخر سمحت تقنية iTRAQ بتحديد SOD2 كمؤشر واعد للكشف عن سرطان الخلايا الكبدية. بالإضافة إلى ذلك فإن تحليل DIGE 2D، التصوير الهلامي و LC MS/MS يسمح بالكشف عن سرطان الكبد و HNSCC في حين ان المستوى العالي لل RETN اللغابي مرتبط بسوء تشخيص ال OSCC. تطوير الطرق المستعملة في البحث عن المؤشرات الحيوية الجديدة للأمراض من شأنه ان يسمح بالكشف عن مؤشرات أكثر خصوصية وأكثر حساسية.

الكلمات المفتاحية: اللغاب، التحليل البروتيومي، المؤشرات الحيوية، الأمراض، التشخيص.