

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

Université Mohammed Seddik BENYAHIA – Jijel

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  
الرقم / 2018 /

## Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de : **Master en Biochimie**

*Thème*

**Exploration du protéome salivaire des patients atteints de candidoses buccales pour la recherche de biomarqueurs**

*Soutenu le : 04 Juillet 2018 par :*

**BOUILOUT Yousra**

**LABIOD Djenat**

### Membres de Jury

**Président :** Mme. REZZAGUI A. MAA, Université MSB, Jijel  
**Encadrant :** Dr. MEDOURI A. MAB, Université MSB, Jijel  
**Examineur :** Mme. ABBES A. MAA, Université MSB, Jijel

**Année universitaire : 2017- 2018**

## *Dédicace*

Avant tout je tiens à remercier ALLAH, le tout puissant de m'avoir procuré la volonté, la force et la patience d'aller jusqu'au bout.

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance .....

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

A ma tendre grand-mère **Yamina**: 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 Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie.

A mes très chers parents **Aicha et Messaoud**

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 Dieu, le tout Puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur

A la mémoire de mon très cher grand père **KOUISSA Ali**  
Que dieu lait en sa sainte miséricorde

A mon encadrant **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 Youcef, AHCEN, Mohamed Dalila, Sakina, Fadila et Salima

A mes chères soeurs Wassila, Chaima, Ghada et Maissa, 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, Hamida, Lyna et Karima

A toutes mes amies Fati, Roofa, Asma, Rima, Sara, Saliha et Manal

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études  
A mon binôme Djenat et tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

*Yousra*

## ***Dédicace***

*À ma première école dans ma vie*

*À celle que ses bénédictions m'ont suivies par pas pendant tout mon parcours*

*À celle de qui j'ai hérité de la patience et le courage pour affronter les difficultés de la vie*

*الله يرحمك يا أمي.*

*À celui qui me soutient et qui m'encourage d'aller vers l'avant pour atteindre mon but*

*À celui qui c'est sacrifié pour m'éduquer et qui sanctifie la science où qu'il soit*

*Que dieux te garde et te protège cher père.*

*À mes chères sœurs qui partagent ma vie et m'ont encouragent à continuer,*

*Surtout Houria et Aziza.*

*À mes neveux*

*À mes frères Fouad, Chouaib, Ferhat et leurs femmes et enfants.*

*À mon binôme yousra,*

*À notre encadrant Dr. MEDOURI A. que je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements.*

*À Mes belles amies Soumia, Widad, Samira et Habiba*

*Au personnel médical et paramédical au service d'analyse médicale de l'hôpital Taher*

*A ceux qui portent les beaux souvenirs avec moi avant de rejoindre Master*

*À tous mes professeurs*

*À toute personne qui a participé à la réalisation de ce mémoire*

***Djenat***

## *Remerciement*

Au nom d'**ALLAH**, Le clément et le Miséricordieux. On trouve dans la tradition Prophétique le hadith : « *Celui qui ne remercie pas les gens n'a pas remercié Allah* ».

Nous voulons exprimer par ces quelques lignes de remerciements notre gratitude envers tous ceux en qui par leur présence, leur soutien, leur disponibilité et leurs conseils, nous ont encouragés d'accomplir ce travail.

Nous tenons tout d'abord à remercier particulièrement et chaleureusement notre encadrant de mémoire **Dr. MEDOURI Asma**, pour la confiance qu'elle a bien voulu nous accorder en acceptant de diriger ce mémoire, pour la qualité de son encadrement, ses précieuses orientations, sa simplicité, sa patience, sa disponibilité, ses conseils et pour le temps qu'elle a consacré pour nous aider.

Nous adressons nos vifs remerciements aux membres du jury pour l'honneur que nous ont fait en acceptant de juger ce travail. Nous remercions Mme REZZAGUI A. qui nous fait l'honneur de présider ce jury. Merci à Mme ABBES A., examinateur de ce mémoire, qu'elle soit assurée de notre sincère reconnaissance

Un grand merci à l'ingénieur du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire **Salima** pour sa disponibilité, sa grande générosité et son assistance, ainsi que tout le personnel du laboratoire de biochimie.

Nos remerciements s'adressent aussi à tout le personnel médical du service d'oncologie, de pédiatrie et médecine interne de l'hôpital de Jijel ainsi que le personnel du service de pédiatrie et médecine interne de l'hôpital de Taher.

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce projet de fin d'études.

## Liste des abréviations

<b>ALS :</b>	Agglutinin-like sequence
<b>APS :</b>	persulfate d'ammonium
<b>AVC :</b>	accident vasculaire cérébral
<b>BSA :</b>	Bovin Serum Albumine
<b>CAH :</b>	classification ascendante hiérarchique
<b>EMEA :</b>	agence européenne pour l'évolution des médicaments.
<b>FPM :</b>	zone de faible poids moléculaire
<b>G1 :</b>	la phase G1 du Cycle cellulaire
<b>HPM :</b>	zone de haut poids moléculaire
<b>IgA :</b>	immunoglobulines A
<b>IOS :</b>	Organisation Internationale pour la Standardisation
<b>NIH:</b>	National Institute of Health.
<b>p/v :</b>	poids par volume
<b>PAGE :</b>	Polyacrylamide gel electrophoresis
<b>PCB :</b>	pomme de terre, carotte, bile
<b>Saps :</b>	Les protéases aspartiques sécrétées
<b>SDS :</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>TCA :</b>	acide trichloracétique
<b>TEMED :</b>	Tétraméthyl-Ethylène –Diamine
<b>Tris :</b>	hydroxyméthyl aminomethan

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Composition inorganique de la salive	Page 12
<b>Tableau 2</b>	Concentration des protéines salivaires totales des échantillons analysés	Page 27
<b>Tableau 3</b>	Fréquences des protéines salivaires de HPM en condition non dénaturante et non réduite	Page 33
<b>Tableau 4</b>	Fréquences des protéines salivaires de FPM en condition non dénaturante et non réduite	Page 34
<b>Tableau 5</b>	Fréquences des protéines salivaires de HPM en condition dénaturantes et non réduites	Page 35
<b>Tableau 6</b>	Fréquences des protéines salivaires de FPM en condition dénaturantes et non réduites	Page 36

## Liste des figures

- Figure 1** Morphologie du *Candida albicans*
- Figure 1** Structure de *Candida albicans*
- Figure 3** Action de la salive sur le développement de la candidose
- Figure 4** Les Candidoses buccales aiguës
- Figure 5** Les candidoses buccales chroniques
- Figure 6** Etapes de la sécrétion salivaire
- Figure 7** Localisation anatomique des glandes salivaires majeures et mineures
- Figure 8** Composition des glandes salivaires
- Figure 9** Zones de lecture des profils électrophorétiques
- Figure10** Electrophorégrammes des protéines salivaires non dénaturées et non réduites
- Figure 11** Electrophorégrammes des protéines salivaires dénaturantes et non réduites
- Figure 12** Dendrogramme des protéines fractionnées par PAGE
- Figure 13** Répartition des classes basée sur la PAGE
- Figure 14** Répartition des classes basée sur la SDS-PAGE
- Figure 15** Dendrogramme des protéines fractionnées par SDS-PAGE

# Table des matières

Introduction.....	1
-------------------	---

## Première partie : Revue bibliographique

### Chapitre 1 : Les candidoses buccales

1.3.5. Habitat de <i>Candida albicans</i> .....	5
1.4. Relations hôte-pathogène.....	5
1.5. Mécanisme favorise la virulence de <i>candida albicans</i> .....	6
1.5.1. Les adhésines.....	6
1.6. Mécanismes spécifiques de défense immunitaire.....	7
1.7. Facteurs favorisant les candidoses buccales.....	8
1.7.1. Facteurs intrinsèques.....	8
1.7.2. Facteurs extrinsèques.....	9
1.8. Le diagnostic de la candidose buccale.....	9
1.8.1. Diagnostic clinique.....	9
1.8.2. Diagnostic mycologique.....	9
1.9. Les différentes candidoses buccales.....	10
1.9.1. Candidoses buccales aiguës.....	10
1.9.2. Les candidoses chroniques.....	10

### Chapitre 2 : La salive

1. La salive.....	12
1.1 Définition.....	12
1.2 Composition biochimique de la salive.....	12
1.3. Caractéristiques physicochimiques de la salive.....	14
1.4 Mécanisme de formation.....	15
2. Les glandes salivaires.....	16
2.1 Anatomie.....	16
2.2 Les types des glandes salivaires.....	16
2.2.1 Les glandes salivaires majeures.....	16
2.2.2. Les glandes mineures.....	17
2.3 Histologie des glandes salivaires.....	17

### Chapitre 3 : Les biomarqueurs

1. Définition des biomarqueurs.....	19
1.2 Les type des biomarqueurs.....	19
1.3 Les critères d'un biomarqueur.....	19
1.4 L'intérêt clinique d'un biomarqueur.....	20
1.5 La recherche et la validation d'un biomarqueur.....	20

## Deuxième partie : Matériel et méthodes

1. Recrutement des patients.....	22
2. Recueil de la salive.....	22
3. Dosage des protéines totales et estimation de la quantité de protéines à déposer .....	22
3.1. Principe de la méthode .....	22
3.2. Contenu du mode opératoire .....	23
3.3. Mesure d'un échantillon inconnu.....	23
4. Electrophorèse monodimensionnelle .....	23
4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) .....	24
4.1.1 Solubilisation des protéines.....	24
4.1.2 Préparation des gels.....	25
4.1.3 La migration électrophorétique .....	25
4.1.4 Coloration et décoloration .....	26
4.1.5 Conservation des gels.....	26
4.2. Analyse des gels.....	26
4.3 Analyse des données .....	26

### **Troisième partie : Résultats et discussion**

1. Dosage des protéines salivaires .....	27
2. Analyse des profils électrophorétiques.....	27
2.1. Analyse des protéines salivaires non dénaturés et non réduits (PAGE).....	28
2.2. Analyse des protéines salivaires dénaturés et non réduits (SDS-PAGE).....	30
3. Analyse du polymorphisme des protéines salivaires.....	32
3.1 En condition non dénaturante et non réduite.....	32
3.1.1 Les protéines salivaires de HPM .....	32
3.1.2 Les protéines salivaires de FPM.....	33
3.2 En condition dénaturantes et non réduites.....	34
3.2.1 Les protéines salivaires de HPM .....	34
3.2.2 Les protéines salivaires de FPM.....	35
4. Classification hiérarchique des patients suivant le protéome salivaire .....	36
4.1 Classification des protéines salivaires fractionnées par PAGE.....	36
4.2 Classification des protéines salivaires fractionnées par SDS-PAGE .....	37
5. Synthèse et discussion générale .....	40
Conclusion .....	43
Références .....	45

Annexes

## ***Introduction***

### Introduction

Depuis de nombreuses années des chercheurs et des cliniciens ont proposé le suivi de variations de protéines salivaires comme de véritables marqueurs de certaines maladies (Cedard et al.1984). 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 (Janice. 2013 ; Hajer. 2016). En effet, des études ont déjà montré que des protéines de la salive peuvent être utilisées pour détecter des maladies telles que la maladie d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson, le cancer du sein, du pancréas, le cancer colorectal, des cancers de la cavité buccale, des infections par le virus du sida, ainsi que les deux types de diabète. Des recherches avaient aussi montré que les protéines de la salive guérissaient des plaies dans la cavité buccale, amplifiaient la voix, développaient le goût et détruisaient les bactéries et les virus (Matsuo, 2000 ; Hadzibegović, 2012 ; Acurio, 2014). Dans ce contexte, la salive peut être 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 marqueurs salivaires (Mandel. 1990 ; Kefalides. 1999). Ces données devraient nous permettre une approche différente de la physiopathologie et de diagnostic des maladies, en particulier celles touchant la cavité buccale siège de la salive humaine.

La candidose buccale est l'infection fongique humaine la plus répandue, induite par des levures du genre *Candida*. Elle résulte d'une perturbation de microbiome oral humain qui est un écosystème complexe composé de plusieurs centaines d'espèces de micro-organismes. Cette flore commensale joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie orale. Habituellement, elle affecte seulement les muqueuses dans un processus inflammatoire, mais les manifestations systémiques rares peuvent avoir un cours fatal (Pauline et al. 2018).

Au cours de ce travail nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux candidoses buccales induites par l'espèce *Candida albicans*. Au niveau de la cavité orale, les candidoses sont bien connues pour leur influence sur le flux salivaire ou encore sur la composition protéique de la salive (Mathieu. 2013)

Nous avons choisi de nous intéresser aux éventuelles variations des protéines salivaires au cours de candidoses buccales, grâce à l'utilisation de nouvelles technologies permettant une analyse exhaustive des protéines salivaires. Dans ce domaine, la protéomique offre la possibilité d'identifier et de quantifier les protéines exprimées par une cellule à un moment donné, dans un tissu donné et dans un environnement donné, ainsi qu'au cours de contextes physiologiques et pathologiques variés (Dutt et Lee. 2000).

Nous avons adopté l'électrophorèse monodimensionnelle comme première étape de l'analyse protéomique afin de séparer les protéines salivaires. Notre démarche consiste à explorer de

## *Introduction*

manière aléatoire les protéines salivaires de sujets sains et de patients atteints de candidoses buccales. Les protéines salivaires variantes pourront être secondairement caractérisées, afin de déterminer si elles sont susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de la pathologie étudiée.

# **|PREMIERE PARTIE**

**Revue bibliographique**

## *Chapitre 1*

# **Les candidoses buccales**

### 1. Candidoses buccales

Les candidoses sont des affections fongiques provoquées par des levures appartenant au genre *Candida*. Ces levures sont à l'origine d'infections superficielles qui peuvent affecter les muqueuses buccales, elles peuvent donc être des infections opportunistes dont les causes sont très variées (Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. 2014). Dans le genre *Candida*, 54,3% des infections sont dues à l'espèce *Candida albicans*, 16,4% à l'espèce *Candida glabrata*, 14,9% à l'espèce *Candida parapsilosis*, 8,2% à l'espèce *Candida tropicalis* et 1,6% l'espèce *Candida krusei* (Eggimann et al., 2003).

#### 1.1 Épidémiologie des candidoses buccales

Lors de son enquête sur l'épidémiologie des candidoses buccales en 1988, Odds a constaté que leur incidence moyenne est de 42,9%. L'incidence de candidose buccale varie selon le type de population : 45% chez les nouveau nés, 45 à 65 % chez les enfants en bonne santé, 30 % à 40% chez les adultes en bonne santé, 50 à 65 % chez les porteurs de prothèses amovibles, 65 à 88% chez les résidents d'institutions de soins de courte ou de longue durée, 78% chez les personnes âgées hospitalisées, 90% chez les leucémique en cours de radiothérapie et jusqu'à 90% des personnes affectées par le VIH (Schmidt-Westhausen et al., 2004).

#### 1.2 Définition de La candidose buccale

La candidose buccale est une mycose de la muqueuse buccale due à un champignon le *Candida albicans*. Elle est très fréquente et apparaît notamment en cas de déficit du système immunitaire (Millsop et al., 2016). Elle se manifeste par une irritation des muqueuses, associée à des rougeurs, allant jusqu'à l'ulcération. Parfois, des tâches blanchâtres, plus ou moins pâteuses peuvent siéger sur la langue et le palais (Belahcen, 2016).

#### 1.3 *Candida albicans*

##### 1.3.1 Définition

*Candida albicans* est une levure pathogène opportuniste, diploïde polymorphe dont le génome comporte huit paires de chromosomes, elle est non capsulée, non pigmentée et aérobie qui vit à l'état saprophyte au niveau des muqueuses (Eggimann et al., 2003).

##### 1.3.2 Classification du genre

La classification des champignons a beaucoup évolué. La classification présentée ici est celle de Barnett qui date de 2000 (El-Kirat-Chatel, 2010).

**Règne :** Champignon

**Phylum :** Ascomycota

**Classe :** Hemiascomycètes

**Ordre :** Saccharomycétales

**Famille :** Candidaceae

**Genre :** *Candida*

### 1.3.3 Caractères morphologiques de *Candida albicans*

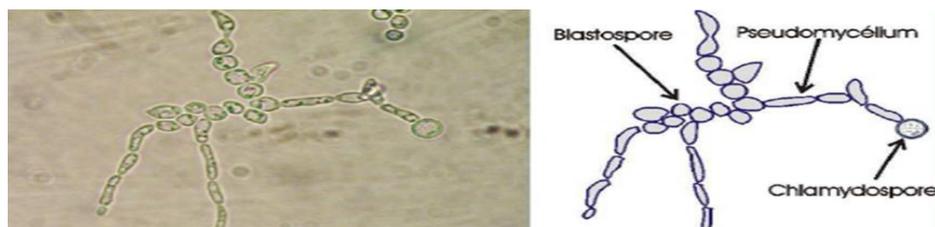
Toutes les transitions morphologiques se mettent en place en réponse à des changements des conditions environnementales et permettent ainsi au champignon de s'adapter à différentes niches biologique (Figure1).

**1.3.3.1 Les blastospores :** étant la forme la plus fréquente de *Candida albicans* saprophyte, elles se présentent sous forme de petites cellules ovoïdes. Ces cellules peuvent se multiplier par bourgeonnement (Sudbery et al., 2004).

**1.3.3.2 Le pseudo - mycélium :** composé d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien (Sudbery et al., 2004).

**1.3.3.3 Le mycélium :** la conversion d'une levure en filament mycélien (Sudbery et al., 2004).

**1.3.3.4 Les Chlamydozspores :** dans leur forme pathogène, elles sont de volumineuses cellules (10 à 15 micromètres), sphériques, à double paroi (Cole et al., 1991).



**Figure 1.** Morphologie du *Candida albicans* (Whiteway et al., 2007)

### 1.3.4. Structure de *Candida albicans*

*Candida albicans* est constitué des organites suivants (Figure 2)

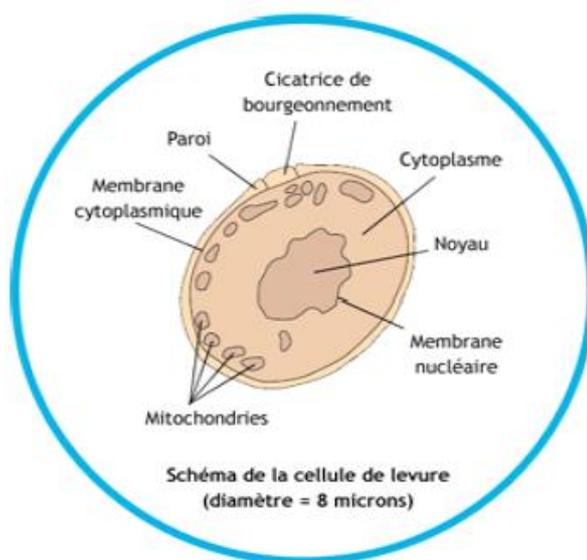
**-Le cytoplasme :** contient un noyau délimité par une double membrane nucléaire, un nucléole, des ribosomes et des mitochondries (Ruiz-herrera et al., 2006).

**-Membrane plasmique :** Constituée de deux feuillets membranaires, elle a un rôle dans le transport actif d'acides aminés, d'oses et de différents ions, ainsi qu'un rôle passif dans la

## Chapitre 1: Les candidoses buccales

régulation des flux moléculaires servant à maintenir la pression osmotique (Ruiz-herrera et al., 2006).

**-La paroi cellulaire** : représentant 15 à 30 % du poids de la levure, elle protège la cellule contre les agressions mécaniques et Chimiques. Elle est constituée des polysaccharides (le glucane, la chitine, le mannane), des protéines et des lipides. La paroi cellulaire joue un rôle important dans les mécanismes de reconnaissance de la levure par l'hôte (Ruiz-herrera et al., 2006).



**Figure 2.** Structure de *Candida albicans* (Chambard, 2009)

### 1.3.5. Habitat de *Candida albicans*

Les caractères biologiques de *Candida albicans* sont :

**-Milieu de vie** : *Candida albicans* est aérobic et vit exclusivement sur les muqueuses, mais il peut cependant survivre dans le milieu extérieur (Pinel et al., 2012).

**-PH** : Une salive acide d'un pH de 3 à 7 est favorable à un développement accru du *Candida albicans* (Pinel et al., 2012).

**-Température** : Dans son état pathogène, *Candida albicans* prolifère à la température normale du corps humain (37°C) (Pinel et al., 2012).

**-Nutrition** : Incapables de synthétiser leurs molécules carbonées, *Candida albicans* vit de la matière organique préformée, et elle a besoin du carbone, azote et vitamines (Scully et al., 1994).

### 1.4. Relations hôte-pathogène

*Candida albicans* est présent sur les muqueuses orales de l'homme sain, puisqu'il existe un équilibre entre les facteurs de virulence du champignon et le système immunitaire de l'hôte

(Million et al., 2002). Une perturbation de cet équilibre la rendre pathogène par leur prolifération et dégradation des cellules et tissus de l'hôte (Flavie, 2014).

### 1.5. Mécanisme favorise la virulence de *Candida albicans*

L'adhérence de *Candida albicans* aux cellules de l'hôte est une étape importante dans la colonisation des muqueuses et dans l'infection qui en résulte. Elle s'effectue par la présence des différentes adhésines (manoprotéines) qui lui permettent de se fixer à de nombreuses cellules et molécules de l'hôte, et par des enzymes hydrolytiques qui interviennent dans le processus d'invasion tissulaire (Pinel et al., 2012 ; Baldo et al., 2007).

#### 1.5.1. Les adhésines

- **Les adhésines de *Candida albicans* caractérisées au niveau moléculaire**

- Chez le *Candida albicans*, une famille de 8 gènes *ALS* (*Agglutinin-like sequence*) codant pour des adhésines, Als1p et Als3p permettent l'adhérence de *Candida albicans* aux cellules épithéliales buccales (Baldo et al., 2007).

- L'adhésine Hwp1 de *Candida albicans* s'est également révélée importante lors d'infection des muqueuses buccales (Baldo et al., 2007).

- Une adhésine de type carbohydrate, présente à la surface des levures de *Candida albicans* intervient également dans l'adhérence aux cellules épithéliales buccales (Baldo et al., 2007).

- **Les adhésines fibrillaires :** La fibrille qui se trouve dans la paroi fongique de *Candida albicans* intervient dans l'adhérence, en se liant à un récepteur lipidique présentant aux niveaux de cellules épithéliales buccales (Baldo et al., 2007).

#### 1.5.2. Sécrétion d'enzymes lytiques

- **Les protéases aspartiques sécrétées :** Les protéases aspartiques sécrétées (*secreted aspartic protease* ou Saps) sont des enzymes qui jouent un rôle essentiel dans la phase d'adhérence aux cellules épithéliales buccales. Ils ont une activité enzymatique pouvant servir à altérer les structures cibles de la cellule de l'hôte, et entraîner ainsi un changement de conformation des protéines de surface qui permettrait une meilleure adhérence de la levure. Ces enzymes sont capables de dégrader différentes protéines humaines présentes au niveau des sites infectés tels que l'albumine, la kératine, le collagène, la mucine, et les IgA sécrétoires (Million et al., 2002).
- **Les phospholipases :** Ils jouent un rôle dans le déroulement du processus infectieux au cours des candidoses, ils facilitent la pénétration de *Candida albicans* en altérant la membrane cellulaire (Million et al., 2002).

### 1.6. Mécanismes spécifiques de défense immunitaire

L'immunité innée et l'immunité acquise sont impliquées dans la résistance aux candidoses et buccale (Pinel et al., 2012).

#### 1.6.1. Immunité innée

La première défense contre *Candida albicans* est la muqueuse buccale, qui agit comme barrière physique bloquant l'accès de *Candida* aux tissus sous-jacents. Plusieurs protéines salivaires sont sécrétées par les cellules de la muqueuse buccale contre *Candida albicans* et contribuent à l'immunité innée. Ces protéines salivaires contribuent à l'inhibition de la croissance de *Candida albicans* et son attachement à l'épithélium oral : (Pinel et al., 2012 ; Kleinegger et al., 2001) L'ensemble de ces protéines salivaires sont :

- **La calprotectine** est une protéine hétérodimérique de 36,5 kDa à un rôle d'inhibition de la croissance *Candida albicans* (Kleinegger et al., 2001).

- **Les défensines** sont de petits peptides cationiques de 3 à 5 kDa, elles ont un rôle antifongique contre *Candida albicans* et exercent une activité chimiotactique à l'égard des monocytes et neutrophile (Niyonsaba et al., 2005).

-**Les histatines** sont des peptides cationiques riches en histidine possédant des propriétés antifongiques et bloque la forme levure de *Candida albicans* en phase G1 (Kavanagh et al., 2004).

-**Le lysozyme** est une hydrolase de 14 kDa, possède une activité fongicide (Niyonsaba et al., 2005).

-**La lactoferrine** est une glycoprotéine de 77 kDa possède une activité fongistatique inhibant la croissance de *Candida albicans* (Lupetti et al., 2000).

- **L'antileucoprotéase** aussi nommée inhibiteur de protéase leucocytaire, est une anti protéase non-glycosylée de 11.7 kDa, possédant un effet fongistatique proportionnel à sa concentration et permet d'inhiber de manière dose-dépendante la croissance de *Candida albicans in vitro* (Chattopadhyay et al., 2004).

#### 1.6.2. Immunité acquise

Le système immunitaire cellulaire joue un rôle majeur dans la lutte contre les candidoses superficielles, ce qui explique la fréquence élevée des candidoses buccale chez les patients présentant un déficit immunitaire cellulaire. Cependant des mécanismes immuns humoraux interviennent aussi pour limiter la prolifération de *Candida albicans* au niveau des muqueuses (Million et al., 2002).

L'immunité acquise met en jeu les lymphocytes T CD4+, qui, une fois mis en contact avec l'antigène *Candida albicans*, se différencient en lymphocytes Th1, Th2 et Th17. Les lymphocytes CD8+ interviennent aussi, mais dans une moindre mesure (Pinel et al., 2012).

### 1.7. Facteurs favorisant les candidoses buccales

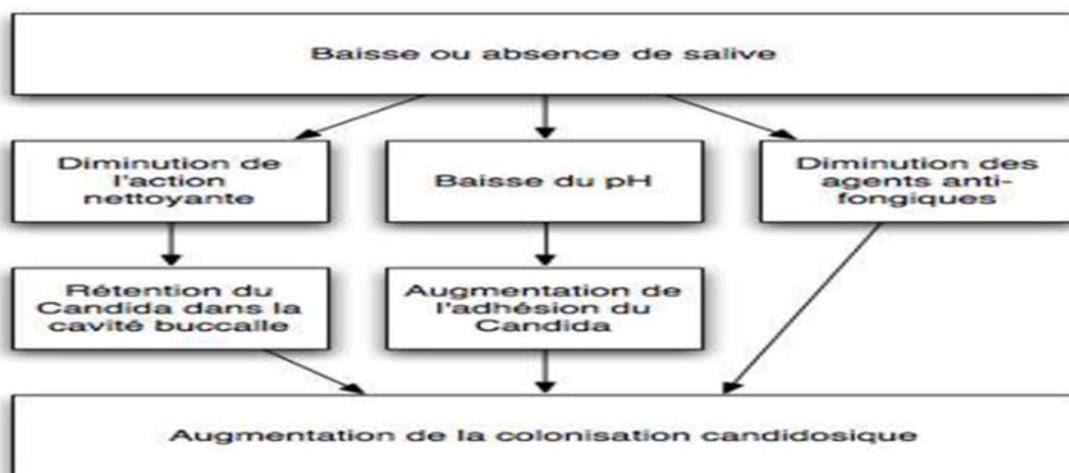
L'infection à *Candida* est une infection opportuniste favorisée par un déséquilibre immunitaire influencé par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques (Caumes et al., 2001).

#### 1.7.1. Facteurs intrinsèques

**-L'âge :** *Candida albicans* est fréquente chez le nouveau-né, le nourrisson avant un an et le vieillard (Caumes et al., 2001).

**-La grossesse :** les femmes enceintes sont exposées au *Candida albicans* en raison de la modification de l'état hormonal (Caumes et al., 2001).

**-La salive :** la salive a une action nettoyante du flux salivaire en grande importance dans la prévention de la colonisation de la cavité buccale par *Candida*. En cas de la diminution du flux salivaire, ceci entraîne une baisse du pH buccal, par conséquent les levures adhèrent mieux à l'épithélium buccal (Figure 3) (Mathieu, 2013).



**Figure 3.** Action de la salive sur le développement de la candidose (Mathieu, 2013)

**-Diabète :** les diverses espèces de *Candida* sont plus fréquemment isolées dans la cavité buccale chez les sujets diabétiques (Caumes et al., 2001).

**-Le déficit de production de la vitamine B12 :** il favorise la virulence et la prolifération des *Candidas* de la cavité buccale (Caumes et al., 2001).

- **le SIDA** : L'infection au VIH cause des perturbations de l'immunité au niveau de la muqueuse buccale, plus évidente est la diminution des lymphocytes T CD4+ (Caumes et al., 2008)

- **Affection maligne** : cancers, hémopathies, aplasies médullaires entraînent une insuffisance de l'immunité cellulaire ou humorale favorisant le développement de maladies opportunistes (Belahcen, 2016).

### 1.7.2. Facteurs extrinsèques

- **Médicaments** : les antibiotiques, les immunosuppresseurs, la radiothérapie cervico-faciale et la chimiothérapie anticancéreuse à large spectre modifient l'équilibre biologique de la flore buccale saprophyte au profit des levures qui peuvent alors proliférer (Bonnot et al., 2013)

- **Mauvaise hygiène buccodentaire** : Elle favorise la survenue d'une candidose buccale et la relation entre le port de la prothèse et la qualité d'hygiène (Mari et al., 2011).

## 1.8. Le diagnostic de la candidose buccale

L'examen clinique doit aboutir au diagnostic, l'examen mycologique ne fera que confirmer la clinique (Pinel et al., 2012).

### 1.8.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic de candidose buccale est avant tout clinique. Les symptômes révélateurs du diagnostic sont divers : douleurs, gêne gingivale, difficultés d'alimentation, une altération du goût, des brûlures, une sécheresse de la bouche, une sensation de soif ou une bouche pâteuse. Elle est cependant asymptomatique chez deux patients sur trois : l'examen de la bouche doit être systématique chez tout patient. Cet examen ne nécessite qu'un éclairage de bonne qualité et un abaisse-langue, il précise les localisations atteintes (Pinel et al., 2012).

### 1.8.2. Diagnostic mycologique

Se fait de deux manières :

**1.8.2.1. Examen direct** : Examen microscopique direct ; on observe des levures bourgeonnantes (Pilly, 2010 ; Caumeset al., 2001).

.

**1.8.2.2. Culture** : La recherche par culture sur milieu PCB, (pomme de terre, carotte, bile). Ainsi qu'une culture sur milieu de Sabouraud qui permet d'isoler un grand nombre de colonies en 48 heures à 72 heures. En cas de résistance à un traitement antifongique (Pilly, 2010 ; Caumeset al., 2001)

### 1.9. Les différentes candidoses buccales

En 1997, Axell et al. Proposa une classification plus simple et plus clinique de candidoses buccale (Belahcen, 2016).

#### 1.9.1. Candidoses buccales aiguës

##### 1.9.1.1. Candidose pseudomembraneuse ou « muguet »

Il s'agit d'une inflammation candidosique aigue présente sous forme de granulations blanchâtres, pseudomembraneuses, a aspect de lait caillé, qui tapissent la langue, la face interne des joues et éventuellement toute la muqueuse buccale (Figure 4A). Le muguet touche essentiellement le nourrisson et le jeune enfant et les dénutritions, à un moindre degré le vieillard et le port d'appareils dentaires, et chez les individus présentant une baisse des défenses immunitaires (VIH+) (Bendel, 2003 ; Pilly, 2010)

##### 1.9.1.2. Candidose érythémateuse

La candidose érythémateuse est associée à l'utilisation chronique des corticostéroïdes, d'antibiotiques à large spectre (Scully et al ., 1994). Elle est caractérisée par une inflammation diffuse de la muqueuse buccale, la langue dépapillée et vernissée et la muqueuse luisante (figure 4 B). Elle peut précéder la survenue d'un muguet. La forme érythémateuse est observée chez les patients VIH et les porteurs de prothèse dentaire (Botterel et al., 2016 ; Pilly, 2010)



**Figure 4.** Candidoses buccales aiguës ; **A** : Muguet buccal (Belahcen, 2016) ;

**B** : Candidose érythémateuse (Pinel et al., 2012)

#### 1.9.2. Les candidoses chroniques

##### 1.9.2.1. Candidose hyperplasique chronique, ou pseudo tumorale

Une hyperplasie épithéliale est notée avec de nombreux micro-abcès. La découverte de cette lésion, considérée comme précancéreuse. La candidose hyperplasique est localisée généralement à l'intérieur des joues, au niveau des Commissures des lèvres, et moins fréquemment sur la langue (figure 5 A). Cette forme est plus fréquente chez les fumeurs. Il

existerait un risque de transformation maligne de ce type de lésion, les langues noires villeuses avec hypertrophie de l'extrémité des papilles (Botterel et al., 2016 ; Scully et al., 1994).

### 1.9.2.2. La perlèche

C'est une érosion fissuraire de la commissure des lèvres, érythémateuse, douloureuse et parfois associée à une chéilite (figure 5 B). Elle est fréquemment associée au cours de l'infection à VIH. Et aussi chez les sujets anémiques, ayant une perte ou un déficit vitaminique et chez les personnes âgées (Pinel et al., 2012 ; Pilly, 2010).

### 1.9.2.3. Stomatite dentaire associée à Candida

C'est un état inflammatoire des gencives chronique qu'on retrouve chez les porteurs de prothèses amovibles (figure 5 C) (Scully et al., 1994).



**Figure 5.** Les candidoses chroniques ; **A** : Les candidoses chroniques Candidose hyperplasique Chronique (Belahcen, 2016) ; **B** : La perlèche (Pinel et al., 2012) ; **C** : stomatite dentaire (Belahcen, 2016)

**Chapitre 2**  
**La salive**

## 1. La salive

### 1.1 Définition

La salive est la première sécrétion digestive, elle désigne un liquide physiologique incolore, alcalin, légèrement visqueux (Ganong, 2005) et d'odeur fade, qui baigne la cavité buccale. Elle est sécrétée par les glandes salivaires mineures et majeures. La salive est multifonctionnelle, servant non seulement à faciliter la digestion, la déglutition, le goût et la lubrification des tissus, mais aussi comme barrière protectrice contre les agents pathogènes (Janice et al., 2013).

### 1.2 Composition biochimique de la salive

L'analyse biochimique de la salive humaine révèle qu'elle est composée de constituants inorganiques et de constituants organiques (protéines et composants non protéiques). Certains composants de la salive sont produits localement dans les glandes salivaires, d'autres constituants sont simplement filtrés à partir du plasma, et d'autres encore sont partiellement réabsorbés, excrétés ou modifiés au niveau des canalicules excréteurs (Lazaro et al., 2015).

**1.2.1. Eau :** La salive est composée à environ 99% d'eau (Zohaib et al., 2016).

#### 1. 2.2. Les constituants inorganiques

Les constituants inorganiques de la salive (0,2%) sont les ions sodium, potassium, calcium, chlorures, phosphates, magnésium, bicarbonate (tableau 1).

**Tableau 1 :** Composition inorganique de la salive (concentration en mmol/L) (Lazaro et al., 2015).

Analyte	Salive	Plasma
Na+	3,0-29,0	136 ,0-145,0
K+	6,4-36,6	3,5-4,5
Ca+2	0,88-2,5	1,15-1,33
Cl-	0-27	98-107
HCO3-	3,0 - 4	24 -27

### 1.2.3. Les constituants organiques

Les composants organiques de la salive sont représentés principalement par des protéines (0,3%) (Janice et al., 2013).

Ces protéines sont classées, en fonction de leur origine on protéines intrinsèques synthétisées par la glande salivaire et protéines extrinsèques dérivées du sérum.

#### ✚ *Protéines extrinsèques*

Représentées par des albumines d'origine sérique (5% à 10% des protéines totales), des immunoglobulines IG A, immunoglobulines G et M, des  $\alpha$  et  $\beta$  globulines, des calprotéctines ou d'autres protéines du système immunitaire (système du complément), leur concentration (20% des protéines totales) décroît lorsque le débit salivaire augmente (Devoize et al., 2011).

#### ✚ *Protéines intrinsèques*

##### ➤ **Les enzymes salivaires**

- ***L'alpha-amylase*** : L'alpha-amylase est une enzyme qui hydrolyse les liaisons  $\alpha$  (1-4) glycosidiques internes, ce qui entraîne la production de maltose et d'oligosaccharides. Les concentrations d'amylase sont les plus élevées dans le pancréas et les glandes salivaires, d'une masse d'environ 56 kDa (Cette protéine représente 30 % du total des protéines salivaires (Urs et al., 2015).

- ***La lipase salivaire*** : principalement produite par les glandes linguales, elle hydrolyse les triglycérides, mais aussi les phospholipides, les esters de cholestérol, ainsi que de nombreux autres esters (Kaczor-Urbanowicz et al., 2016).

- ***le lysozyme*** : a un pouvoir antiseptique et agit comme une enzyme lytique capable de lyser des bactéries.

- ***les lactoperoxydases*** : contribue à rendre un milieu antiseptique en utilisant le thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) comme substrat. Le thiocyanate est oxydé par l'enzyme en utilisant le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), produisant des ions qui dénaturent les protéines bactériennes (Kaczor-Urbanowicz et al., 2016).

##### ➤ **Les 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  $\mu\text{g/ml}$ ) et sub-mandibulaire (1,335-270  $\mu\text{g/ml}$ ) (Oudhoff et al., 2008).

### ➤ Les mucines

On distingue deux grandes familles de mucines : MG1 (molécules à poids moléculaire élevé, supérieur à 1 MDa, et fortement glycolées) et MG2 (molécules à bas poids moléculaire, compris entre 200 et 250 KDa), conférant à la salive son pouvoir lubrifiant. (Oudhoff et al., 2008).

### ➤ Les histatines

Les histatines sont des petites protéines (3 à 5 KDa) riches en histidine, auraient une activité antifongique (Tel que le *Candidat albicans*) (Devoize et al., 2011).

### ➤ Les cystatines

Les cystatines sont des inhibiteurs naturels des protéases à cystéine. Leur rôle serait de protéger les tissus buccaux de ces enzymes (Devoize et al., 2011).

### ➤ Les lactoferrines

La lactoferrine est une protéine fixatrice du fer, appartenant à la famille des transferrines. Elle possède des effets bactériostatiques, bactéricides, virucides et fongicides (Devoize et al., 2011).

### ✚ Autres composants organiques

Dans la salive, on trouve également des constituants tels que l'urée, l'acide urique et le cholestérol (Devoize et al., 2011 ; Kaczor-Urbanowicz, Martin et al., 2016)

## 1. 3. Caractéristiques physicochimiques de la salive

### • Le volume

Les adultes en bonne santé produisent environ 1.5 litre de salive par jour, 0.3 à 0.5 ml de salive est sécrété par minute au repos, tandis que 1.5 ml/min est produit dans des conditions de stimulation maximale (Holmberg et al., 2014).

### • La température :

La température orale, et donc celle du milieu salivaire, présente d'importantes variations circadiennes. Ses valeurs oscillent entre 36,2 et 37,2°C (Li et al., 2015)

### • pH :

Il exprime l'acidité ou l'alcalinité de la salive, il est légèrement acide compris entre 6 et 7 (Zohaib et al., 2016).

### • Pouvoir tampon

Le pouvoir tampon de la salive, met en jeu trois systèmes tampon : les bicarbonates, les phosphates, et les protéines. Le pouvoir tampon de la salive augmente avec la stimulation il est presque inefficace pendant les période de faible stimulation (le PH salivaire peut descendre alors à un niveau de 5,3) ( Tarsitano et al., 2015).

- **viscosité**

La viscosité peut être définie comme la résistance à l'écoulement uniforme et sans turbulence se produisant dans la masse d'une matière. La viscosité est fonction de la proportion de cellules acineuses muqueuses par rapport aux cellules séreuses (Szpirglas et al., 1999).

### **1.4 Mécanisme de formation et de control**

#### **1.4.1. Mécanisme de formation**

La formation de la salive se déroule en deux étapes distinctes :

##### **1.4.1.1 La salive primaire**

La première phase se déroule au niveau de l'acinus où le fluide plasmatique est filtré à travers les cellules acineuses sans modification ionique notable et aboutit à la formation d'une salive isotonique au plasma appelé : salive primaire constituée essentiellement d'eau, d'électrolytes et de protéines, La différence de pression entre les cellules acineuses et les capillaires permet la fuite d'eau plasmatique et des ions (Pedersen et al., 2002).

##### **1.4.1.2 La salive définitive**

La seconde phase s'effectue au niveau des canaux striés où la salive primaire est modifiée par une sécrétion et une réabsorption d'électrolytes conduisant à la formation d'une salive finale fluide hypotonique au plasma, une forte réabsorption de sodium et une augmentation de potassium enrichit la salive définitive. De plus une sécrétion d'ions bicarbonates permet la régulation du pH salivaire d'où le pouvoir tampon de la salive (Figure 6) (Pedersen et al., 2002).

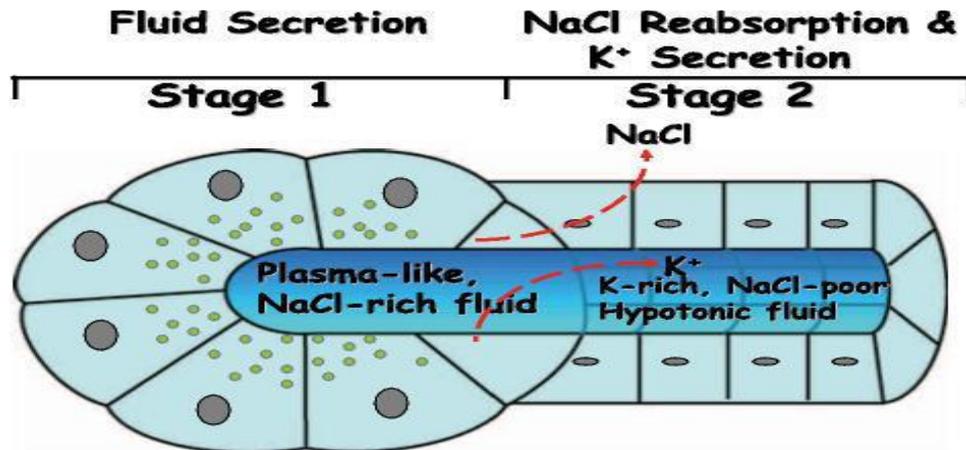


Figure 6. Etapes de la sécrétion salivaire (Catalan et al., 2009)

## 2. Les glandes salivaires

### 2.1 Anatomie

La salive est générée dans les glandes salivaires par des cellules acineuses, recueillie dans de petits canaux, puis relâchée dans la cavité buccale, pour cela, les glandes salivaires sont considérées comme exocrines en fonction (Janice et al., 2013).

### 2.2 Les types des glandes salivaires

#### 2.2.1 Les glandes salivaires majeures

##### ➤ *La glande parotide*

C'est la plus volumineuse des glandes salivaires, elle pèse environ 25 grammes (Mambrini, 2006). Elle est située en dessous et en avant du pavillon de l'oreille. Elle est composée uniquement de cellules acinaires séreuses groupées en lobules. La glande parotide contient également un nombre important de canaux intercalaires et une quantité moins importante de canaux striés, par lequel une salive fluide riche en protéines est sécrétée dans la bouche (Pedersen et al., 2002).

##### ➤ *La glande sous-maxillaire*

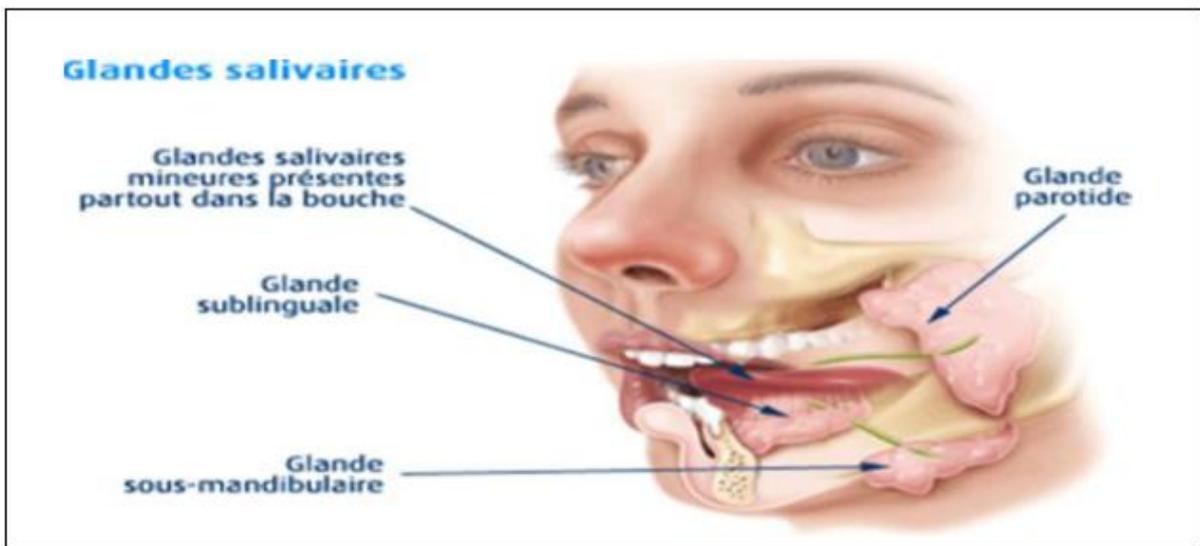
De volume moins important que la glande parotide, elle se situe sous les parties latérales du corps de la mandibule, dans la région sous mandibulaire. Elle a la forme d'une grosse amande et pèse environ 7 g. Elle mesure 4 à 5 cm est considérée comme une glande mixte, contenant majoritairement des cellules acinaires séreuses mais aussi des cellules muqueuses. Elle possède des canaux intercalaires et un nombre plus important de canaux striés. La glande sous maxillaire sécrète une salive riche en protéine et en mucine (Mambrini, 2006).

### ➤ *La glande sublinguale*

Est la plus petite des glandes majeures elle a la forme d'une olive aplatie, pèse environ 3 g et mesure 2.5 cm à 3 cm dans son grand axe. C'est une glande muqueuse se trouve dans la fosse sublinguale, La glande sublinguale sécrète un produit visqueux (Heinrich et al., 2014).

### 3.2.2. Les glandes mineures

Les glandes mineures, estimées à entre 600 et 1000, sont situées dans les régions buccale, labiale, palatale et linguale de la cavité orale. Leur type cellulaire varie selon la glande. Leur sécrétion représente environ 8% de la salive totale (Figure 7) (Eliasson et al., 2010).



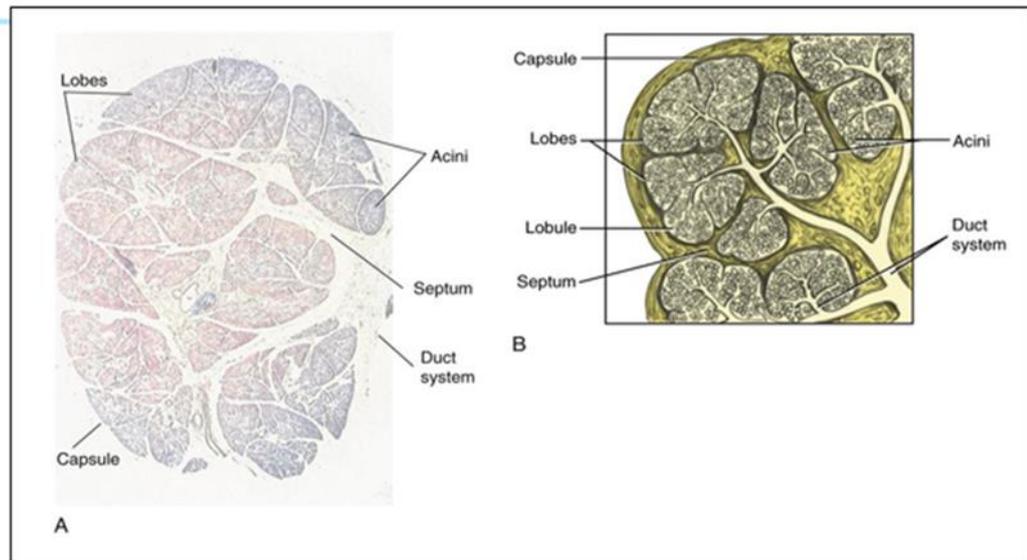
**Figure 7.** Localisation anatomique des glandes salivaires majeures et mineures (Amerongen et al., 2002)

### 2.3 Histologie des glandes salivaires

Les glandes salivaires sont composées d'unités sécrétoires les acini, et excrétoires les canaux. Elles Produisent des substances de nature soit **muqueuse** (visqueux) soit **séreuse** (aqueux). Par ces dernières on différencie : les glandes séreuses, muqueuses et de type mixte (Szipirglas et al ., 1999).

#### ❖ **Le parenchyme salivaire**

Les glandes salivaires sont constituées d'un parenchyme glandulaire et de tissu conjonctif. Leur structure est acineuse ou tubuloacineuse, c'est-à-dire qu'elles sont organisées en lobes constitués de plusieurs lobules composés par les acini (Vidailhet et al., 2008).



❖ **Acini**

L'acinus est formé d'un groupe de cellules sécrétrices rassemblées autour d'un canal collecteur désigné sous le nom de canal intercalaire. Des cellules myoépithéliales se trouvent autour des canaux intercalaires et des acini dont leurs prolongements cytoplasmiques renferment des myofibrilles contractiles aidant l'expulsion de la salive. Selon leur produit de sécrétion et leur morphologie, on différencie plusieurs genres d'acini : l'acinus séreux, l'acinus muqueux, l'acinus mixte (Vidailhet et al., 2008).

❖ **Canaux excréteurs**

Les produits élaborés par les acini sont évacués par un système de canaux, avant d'être sécrétée dans la cavité orale, la salive passe par une série de 4 canaux : canal intercalaire, canal strié, canal excréteur et canal collecteur (Boutebba, 2015).

*Chapitre 3*  
**Les biomarqueurs**

### 1. Définition des biomarqueurs

Les biomarqueurs peuvent être définis selon l'EMA (agence européenne pour l'évaluation des médicaments) comme des paramètres biologiques (caractéristiques génétiques, protéines, métabolites) qui permettent de caractériser un état physiologique, un état pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement (Adébiotech, 2009). 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), autrement dit on peut considérer un biomarqueur comme un changement observable et /ou mesurable aux niveaux moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition d'un individu (actuelle ou passée) à une ou plusieurs substances chimiques (Eberlé, 2008).

#### 1.2 Les types des biomarqueurs

D'après les instituts américains de la santé (NIH : National Institute of Health) les biomarqueurs peuvent être classés en 4 groupes :

**1.2.1 Les biomarqueurs pronostiques** (diagnostiques) : permettant de séparer une population suivant des caractéristiques évolutives propres.

**1.2.2 Les biomarqueurs prédictifs** : permettent d'estimer le succès du traitement mis en place.

**1.2.3 Les biomarqueurs pharmacodynamiques** : permettant de suivre la réponse à une intervention thérapeutique.

**1.2.4 Les biomarqueurs de substitutions** : permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement en l'absence de données cliniques (Lennon, 2014 ; Charpentier, 2011).

#### 1.3 Les critères d'un biomarqueur

Plusieurs éléments sont nécessaires pour qu'un biomarqueur biologique soit désigné comme utile pour la pratique clinique courante :

- Le biomarqueur doit être facilement détectable dans un liquide biologique.
- La modification de la concentration du biomarqueur doit être prédictive du risque de survenue d'un phénotype bien défini.
- Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui expliquent la relation entre le biomarqueur et le phénotype qu'il est censé prédire ou de diagnostiquer sont compris.

- La relation entre la concentration du biomarqueur et l'amplitude du risque (ou la gravité du phénotype) est linéaire.
- Le biomarqueur doit prédire, de manière indépendante des autres facteurs de risque cliniques ou d'autres biomarqueurs, la survenue du phénotype en question.
- La cinétique de modification de la concentration du biomarqueur doit être connue et reproductible pour un phénotype donné ou une intervention thérapeutique (Longrois, 2009).

### 1.4 L'intérêt clinique d'un biomarqueur

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.
- évaluer les propriétés diagnostiques du biomarqueur en les comparant à celles de la méthode de référence.
- démontrer que les propriétés diagnostiques du biomarqueur augmentent la capacité du médecin à prendre une bonne décision ; ceci peut être parfois difficile car le moment du diagnostic peut être difficile à identifier (Riou, 2012).

### 1.5 La recherche et la validation d'un biomarqueur

#### 1.5.1 Recherche

Les technologies à haut débit, appelées approches « omics » (la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique) ont un grand potentiel pour la découverte de nouveaux biomarqueurs, l'ensemble de ces techniques est basé sur une analyse différentielle, qui consiste à comparer différents échantillons représentatifs (tissus, sang, biopsies, liquides biologiques...) d'un état donné par exemple sain/malade ou encore pathologie1/pathologie2 (Lennon, 2014).

Les biomarqueurs sont identifiés par l'étude de la corrélation statistique existant entre la présence ou l'intensité d'expression d'un marqueur biologique particulier (ADN, ARN, protéine, métabolite) et le résultat clinique observé (symptômes de la maladie, effets secondaires, efficacité), donc les caractéristiques biologiques identifiées uniquement dans l'échantillon du patient par mesures répétées ou différenciellement par rapport à un témoin

Peuvent alors être considérées comme des biomarqueurs de l'état physiologique correspondant (Cummings, 2008).

### **1.5.2 Validation**

Une fois les candidats biomarqueurs identifiés, leur pertinence clinique doit être démontrée (Adébiotech. 2009). Le but du développement et de la validation des biomarqueurs devient donc de «développer un test valide» plutôt que de «valider une méthode développée» donc le processus de validation du biomarqueur passe par deux étapes : La validation de la méthode de dosage qu'elle est définie par l'Organisation Internationale pour la Standardisation (IOS) comme « la confirmation par l'expérimentation et les preuves objectives issues de ces expérimentations que les conditions requises pour une utilisation définie sont remplies » et la validation clinique c'est-à-dire de transférer le test ou la méthode de dosage dans la pratique clinique (Cummings, 2008).

# DEUXIEME PARTIE

## Matériel et méthodes

## **1. Recrutement des patients**

Notre étude a porté sur une population de 24 patients atteints de candidoses buccales (hommes, femmes et enfants) provenant de l'hôpital de Jijel (service de médecine interne, de pédiatrie et d'oncologie) et de Taher (service de médecine interne et de pédiatrie). Les patients recrutés se répartissent sur une tranche d'âge allant de 5 à 88 ans. Les patients incapables de cracher ont été exclus de l'étude. La population d'étude a été comparée à un sujet sain sans pathologie connue et possédant une bonne hygiène buccale.

## **2. Recueil de la salive**

Pour le recueil de la salive nous avons adapté la méthode décrite par Hirtz et al. (2005) avec quelques modifications. La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner environ 10 heures du matin, après que le patient se soit brossé les dents avec une brosse à dents 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 parafilm environ (3cm<sup>3</sup>), pendant quelques minutes, 1ml de salive totale est ainsi prélevé dans des tubes stériles.

Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 x g pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines, les débris cellulaires et alimentaires encore présents dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé (-20°C) jusqu'aux analyses.

## **3. Dosage des protéines totales et estimation de la quantité de protéines à déposer**

La comparaison de l'expression des protéines salivaires entre témoin et malades nécessite un dosage préalable des protéines. Ceci permet de déterminer précisément la quantité déposée sur chaque piste de gel (quantité constante) ; exigence requise pour les comparaisons entre les profils. Dans cette perspective, la méthode de dosage des protéines par le colorant Bradford a été mise en œuvre (Annexe 2).

### **3.1. Principe de la méthode**

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie « Bleu brillant G » après liaison avec les acides aminés aromatiques

(tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

Le complexe protéines-colorant produit un déplacement du maximum d'absorption du colorant de 465 à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon. Le dosage des échantillons à analyser se fait à partir d'un étalonnage d'une solution de BSA (Bovin Serum Albumine) de concentration connue et préparée simultanément dans les mêmes conditions.

La technique a été réalisée dans le laboratoire de biologie moléculaire à Jijel.

### 3.2. Contenu du mode opératoire

- Homogénéiser le contenu de la bouteille de réactif et la laisser à température ambiante.
- Préparer le nombre nécessaire de tubes plus 5 tubes pour la gamme.
- Préparer la gamme étalon à l'aide de la BSA (Sérum albumine bovine, 2mg/ml) : Le 1<sup>er</sup> tube correspond au blanc et ne contient pas de protéines. Il est conseillé de changer de pointe entre chaque tube pour déposer précisément le volume prescrit.

### 3.3. Mesure d'un échantillon inconnu

Pour déterminer la concentration d'un échantillon inconnu : préparer une cuve avec 3mL de réactif de Bradford ajouter 0.1mL de l'échantillon puis lire son absorbance et la reporter sur la courbe d'approximation qui permet de retrouver sa concentration sur l'axe des ordonnées.

## 4. Electrophorèse monodimensionnelle

Toutes les techniques d'électrophorèse sont basées sur le principe de mobilité séquentielle des protéines dans un support soumis à un courant électrique. Cette mobilité est fonction de : (1) la charge électrostatique fournie par les cinq acides aminés acides ou basiques ; (2) La dimension et la forme des protéines ; (3) L'intensité du champ électrique (tension aux électrodes et conductibilité de support) ; (4) La taille des mailles du support ; (5) La température de l'électrolyte. La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par Laemli (1970) modifiée par Singh et al. (1991). La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu, en présence ou non d'un détergent ionisé, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Le SDS détruit les liaisons faibles. Ceci aboutit à la formation d'un complexe SDS-protéines dénaturé avec une charge négative qui masque la charge nette intrinsèque des protéines et annule ainsi la différence de migration due à la charge électrique. Il permet donc une séparation selon la taille,

la conformation et la masse moléculaire. La vitesse de migration des protéines dépend surtout de la taille des mailles du gel et de la température de l'électrolyte.

### 4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Le gel de polyacrylamide est une macromolécule réticulée, utilisée comme support d'électrophorèse. Ce gel est un copolymère d'acrylamide et de N-N' -méthylène bis-acrylamide. Ce dernier assure le pontage entre les chaînes de polyacrylamide. La vitesse de déplacement des protéines dépend de la taille des mailles du gel de polyacrylamide. En modifiant le taux de pontage, il est possible de modifier la réticulation et calibrer le diamètre des pores entre 0,5 et 4 mm. Dès lors, le gel se comportera comme un tamis moléculaire. Cet effet de tamis se superpose à la séparation électrophorétique. La polymérisation de l'acrylamide se fait après ouverture des doubles liaisons, elle nécessite la présence de deux catalyseurs : le Tétraméthyl-Ethylène -Diamine (TEMED), de formule  $(\text{CH}_3)_4(\text{CH}_2)_2\text{N}_2$  et le persulfate d'ammonium (APS), de formule  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ . La taille des pores du gel est conditionnée par deux facteurs :

- La proportion des molécules ponts (N, N'-méthylène bis acrylamide) qui assure la réticulation.
- La concentration totale en acrylamide, bis-acrylamide. la taille des pores diminue quand cette concentration augmente

Les protéines varient énormément non seulement en poids mais aussi en charge et en forme. Pour les séparer, selon leur masse uniquement, il faut contrecarrer l'effet de leur charge et de leur forme. Ceci est accompli en mettant du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dans le gel d'électrophorèse et dans le tampon de migration. Le SDS de formule  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3^- \text{Na}^+$  est un détergent anionique qui dénature la chaîne polypeptidique. Il agit sur les protéines de plusieurs façons :

- Il confère aux protéines une charge négative proportionnelle à leur longueur. Il masque ainsi la charge propre des protéines.
- Il rompt les ponts hydrogène, bloque les interactions hydrophobes et déplie partiellement les protéines.

#### 4.1.1 Solubilisation des protéines

La solubilisation des protéines a été réalisée à partir de la salive des patients malades et du sujet sain obtenue après centrifugation de la salive totale.

Les protéines salivaires sont solubilisées selon deux conditions :

**Condition non dénaturante** ; dans une solution à base de Tris-HCl 0.062M pH 6.8, 2%, 10% glycérol (v/v), 0.01% bleu de bromophenol (p/v),

**Condition dénaturante** : dans une solution à base de Tris-HCl 0.062M pH 6.8, 2% SDS (p/v), 10% glycérol (v/v), 0.01% bleu de bromophenol (p/v).

### 4.1.2 Préparation des gels

Le support d'électrophorèse est formé d'un gel de séparation (separating gel) à T=12.58% et d'un gel de concentration (stacking gel) à T=5%. Ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 40% (p/V), de de N, N'-méthylène bis-acrylamide à 2% (p/v) et de Tris-HCl 1M, tamponnés à PH 8.8 pour le gel de séparation, et à PH 6.8 pour le gel le gel de concentration. Ces deux gels sont polymérisés en présence de l'APS comme catalyseur (persulfate d'ammonium) et du TMED comme accélérateur de la réaction de polymérisation du gel.

Le gel de séparation est préparé en premier, bien mélangé puis coulé entre deux plaques en verre (10x10cm), en laissant un vide de 2 cm pour le stacking gel. Une fine couche d'éthanol est ajoutée pour niveler le gel et pour le protéger de l'air, la polymérisation s'effectue à une température ambiante. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé, est des peignes sont rapidement insérés.

Après la polymérisation du stacking gel, les peignes sont enlevés en obtenant ainsi des puits servant pour les dépôts des extraits protéiques. Les puits sont remplis avec du tampon avant le dépôt des échantillons.

### 4.1.3 La migration électrophorétique

Après le dépôt des différents échantillons, la cuve d'électrophorèse (bac inférieur) est remplie à un niveau suffisant avec le tampon d'électrophorèse. Ensuite, le bac supérieur situé entre les deux plaques (bien serré contre les joints pour éviter les fuites) est rempli lui aussi avec le même tampon jusqu'à ce que les faces supérieures des gels soient immergées. Ensuite, ce dernier est placé dans la cuve d'électrophorèse pour que les faces inférieures des gels plongent dans le tampon. Enfin, la cuve est fermée et reliée à un générateur qui va assurer le passage du courant électrique. Le gel de dimension 100x100x1.5 mm est soumis à une intensité constante de 25 mA, et une tension ne dépassant jamais le maximum. La cuve d'électrophorèse est maintenue à une température constante à 10°C grâce à un système de refroidissement. Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont séparées selon leur encombrement moléculaire. La migration est arrêtée après la sortie du front coloré.

### **4.1.4 Coloration et décoloration**

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

### **4.1.5 Conservation des gels**

Une fois les gels décolorés, ils sont placés dans une solution du glycérol à 10% pendant 1 heure d'agitation au minimum pour être ensuite séchés et conservés entre deux feuilles de papier polyéthylène.

## **4.2. Analyse des gels**

Il s'agit d'une lecture biochimique qui consiste à déterminer la mobilité de chaque bande décelable dans le gel et la localiser dans la zone de haut ou de faible poids moléculaire pour donner un poids moléculaire approximative à chaque bande protéique. Ensuite une matrice binaire de présence/absence a été élaborée. 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.

## **4.3 Analyse des données**

La courbe d'étalonnage de la BSA et la détermination des concentrations des protéines totales salivaires ont été établis par Excel 2013.

La classification ascendante hiérarchique (CAH) ou l'analyse en cluster entre les profils protéiques a été effectuée par XLSTAT (version 2018.20.5) en se basant sur la similarité générale.

# TROISIEME PARTIE

## Résultats et discussion



Cette étude a été basée sur la séparation des protéines salivaires totales par la technique d'électrophorèse dans le but de chercher des biomarqueurs salivaires de la pathologie en question.

### 1. Dosage des protéines salivaires

Les échantillons des protéines sont obtenus à partir de 0.1 ml de salive stimulée puis dosés par la technique de Bradford (595 nm) en utilisant la BSA comme standard.

Les concentrations des protéines salivaires totales des échantillons à analyser par électrophorèse sont présentées dans le tableau 2.

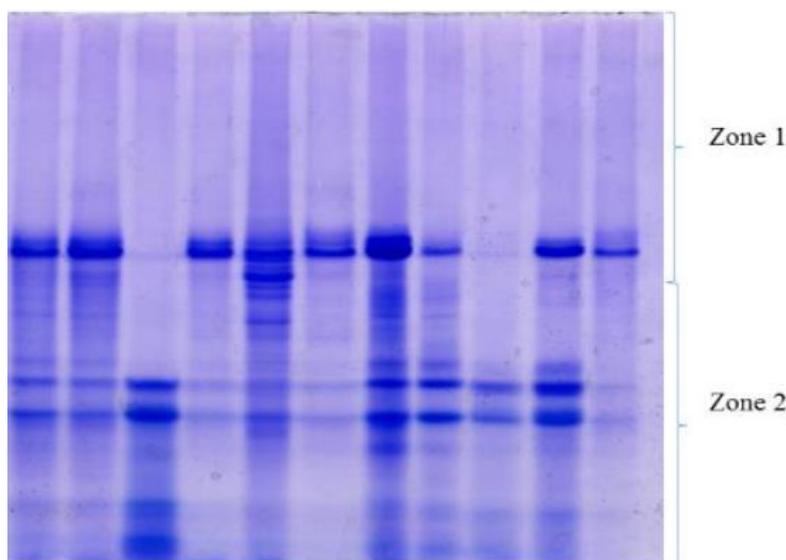
**Tableau 2 :** Concentration des protéines salivaires totales des échantillons analysés

Echantillon	T	1	2	3	4	6	7	8	10	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
[C] mg/ml	3.789	3.215	3.183	2.725	4.608	2.874	3.548	2.475	4.132	2.785	3.872	2.754	4.574	3.232	3.125	2.841	4.012	3.062	3.146	4.704	3.157	4.222

Les dilutions nécessaires sont effectuées de façon à déposer une quantité de 250 µg de protéines dans chaque puits.

### 2. Analyse des profils électrophorétiques

La technique adoptée pour l'analyse est celle décrite par Laemmli (1970) et modifiée par Singh et al. (1991) qui a été utilisée pour fractionner les protéines salivaires. Cette technique permet d'obtenir l'ensemble des protéines. 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. Les diagrammes électrophorétiques sont lus par zone ; une zone de haut poids moléculaire « HPM » ou zone 1 allant de 150 KDa à 30 KDa et une zone de faible poids moléculaire « FPM » ou zone 2 allant de 30 KDa à 10 KDa (Figure 10).



**Figure 9.** Zones de lecture des profils électrophorétiques

### **2.1. Analyse des protéines salivaires non dénaturés et non réduits (PAGE)**

Les diagrammes des 21 échantillons analysés (20 malades et 1 témoin) renferment de 2 à 9 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires avec des mobilités allant de 10 mm à 82 mm (Figure 11).

Nous dénombrons 18 bandes protéiques de mobilités différentes qui se répartissent comme suit : 10 bandes protéiques dans la zone 1 caractérisées par la gamme de masse moléculaire approximative de 150-30 KDa et 8 bandes protéique dans la zone 2 caractérisées par la gamme de masse moléculaire approximative 30-10KDa (Annexe 3).

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et du sujet sain révèle des variations quantitatives et qualitatives remarquables. La variation la plus importante observée était remarquée dans la zone de HPM (zone 1), la première bande protéique 1 de mobilité 10 mm est présente chez le témoin avec une intensité importante et d'une intensité moyenne à faible chez les patients 8, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, alors qu'elle est absente chez le reste des patients.

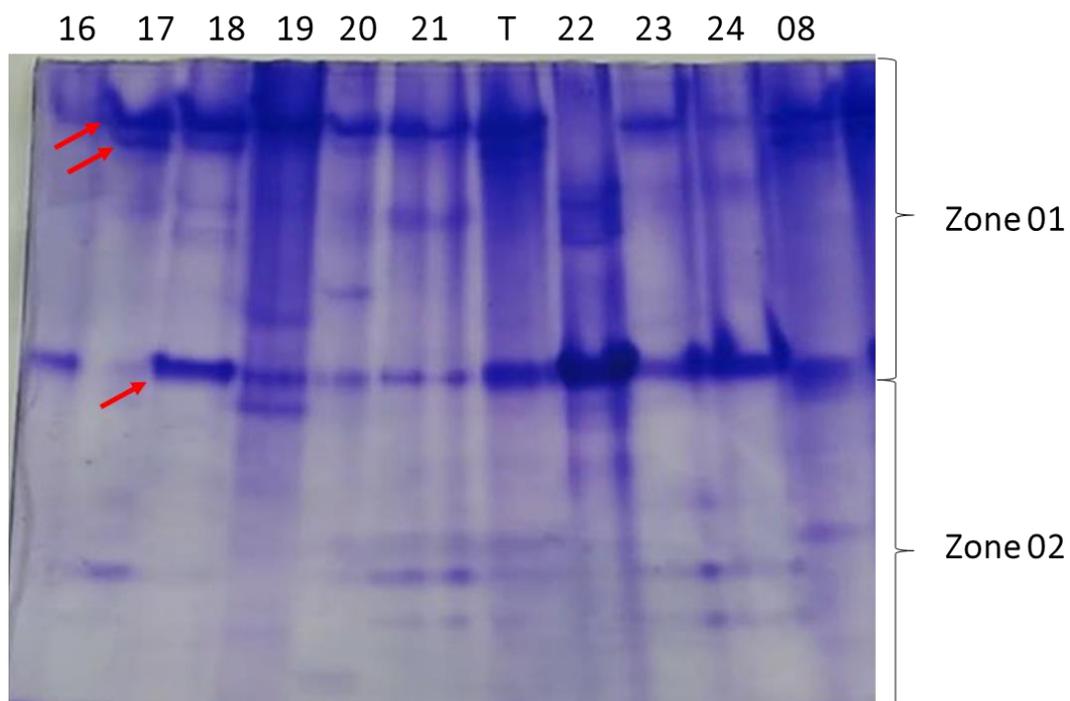
De même, la bande protéique de mobilité 12 mm présente des variations qualitatives et quantitatives importantes, elle est présente chez le témoin à une concentration modérée et est faiblement concentrée chez les patients 1, 2, 7, 20, 23 et absente chez les patient 6, 10, 14, 16, 19, 21, 22, 24.

Les poids moléculaires approximatifs de ces bandes sont estimés à 150 et 100 KDa respectivement. Les variations qualitatives et quantitatives de ces deux bandes entre patients

(faible intensité à absence) et témoin (présence) peuvent être interprétées par la dégradation de ces protéines au cours de la maladie. La sécrétion des enzymes lytiques de *candida albicans* (protéases) peuvent être à l'origine de cette dégradation (Baldo, Mathy et al. 2007).

La bande protéique 11 de mobilité 40 mm est présente chez le témoin (intensité moyenne) et tous les échantillons avec des concentrations variables. Le patient 10 présente une très forte intensité de cette bande protéique, alors qu'elle est absente chez les patients 17, et présente une intensité très faible chez les patients 3 et 4. Ces différences observées entre patients sont probablement dues d'une part à la dégradation des protéines par les enzymes lytiques de *Candida albicans*, d'autre part à l'évolution pathologique associée avec l'âge et le sexe (Murr, christiane et al. 2017). En outre, cette variabilité d'expression de cette bande protéique (absente à faiblement concentrée chez tous les patients/ fortement concentrée chez un seul patient) peut être due à la dégradation de certaines protéines salivaires par des protéases exogène lors du recueil de la salive (Benjamin, Schulz et al. 2013 ; Jasim, Olausson et al. 2016).

Il y a aussi des bandes protéiques qui présentent des variations qualitatives importantes telles que les bandes 7 et 8 qui ne sont présentes que chez les patients 1 et 20 respectivement (zone 1), les bandes 17 et 18 (zone 2) qui sont présentes chez le patient 14 uniquement, et la bande 13 retrouvée seulement chez le patient 1. Ces différences observées entre les patients peuvent être probablement dues à des facteurs tels que ; l'évolution de la maladie, les pathologies associées (état hormone) (pauline, claire et al. 2018).



**Figure10.** Electrophorégrammes des protéines salivaires non dénaturées et non réduites

### 2.2. Analyse des protéines salivaires dénaturés et non réduits (SDS-PAGE)

Les diagrammes électrophorétiques des 18 échantillons (17 malades et 1 témoin) analysés renferment de 1 à 18 bandes protéiques décelables qui se répartissent dans les deux zones de poids moléculaire avec des mobilités allant de 8 à 74 mm (Figure12).

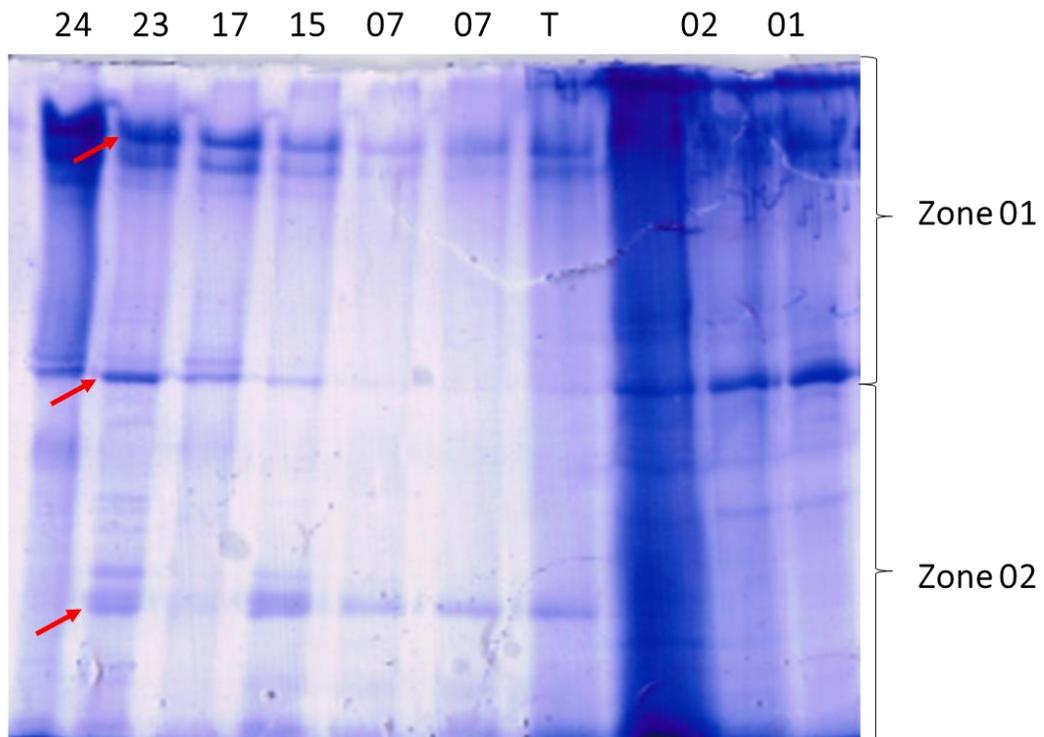
Les diagrammes sont lus par zone. Nous dénombrons 17 bandes protéiques de mobilités différentes qui se répartissent comme suit : 8 bandes protéiques dans la zone 1 et 9 bandes protéiques dans la zone 2, qui sont caractérisées par les gammes de masse moléculaire approximative de 150-30 KDa et 30-10 KDa respectivement (Annexe 3).

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et des sujets sains révèle des variations quantitatives et qualitatives importantes. La bande protéique 1 de mobilité 0.8 mm est omniprésente et est fortement concentrée chez les patients 4, 17, 23, 24 bien qu'elle est faiblement retrouvée chez le témoin. Cette variation est probablement due à l'augmentation de sécrétion des protéines salivaires fongicides présente à l'état physiologique (Armand, Ngounou et al.2015).

La bande 8 de mobilité 36 mm est absente chez les patients 3, 8, 13, 20 et 21 alors qu'elle est présente à l'état de traces chez le témoin et les patients 7 et 6 qui présentent un état initial de la maladie et avec de forte concentration chez le reste des patients. Cela peut être dû à l'augmentation des protéines fongicides parmi eux les lactoferrines (77 KDa) (Lupetti, Paulusma- Annema et al. 2000).

Certaines protéines ne sont détectées que chez quelques patients (avec absence chez le témoin) :

Dans la zone 2 la bande protéique 14 de mobilité 57 mm est retrouvée uniquement chez les patients 15, 18, 22, 23. La bande protéique 16 de mobilité 70 mm est détectée chez les patients 6, 18, 23, 24. D'après les pathologies associées à ces patients, ces variations qualitatives sont probablement liées à plusieurs facteurs extrinsèques tels les antibiotiques, la chimiothérapie, l'état nutritionnel (favorisent la survenue des candidoses) (Mayer, wilson et al.2013). Ceci peut être aussi traduit par la synthèse des protéines antifongiques telles : la calprotéctine (36,5 KDa) pour la bande protéique 14 et l'antileucoprotéase (11,7KDa) pour la bande protéique16 (Sweet, Denbury et al. 2001 ; Chattopadhyay, Gray et al. 2004)



**Figure 11.** Electrophorégrammes des protéines salivaires dénaturantes et non réduites

La dernière bande protéique de la zone 2 (bande 17 de mobilité 74mm) est faiblement présente chez le témoin avec des concentrations modérées chez les patients 1, 7, 15, 18, 23, 24 alors qu'elle est absente chez le reste des patients. Cette variation peut être interprétée par la sécrétion des protéines salivaires défensives telles les défensines et les histatines de poids moléculaire d'environ 3 à 5 KDa (Niyonsaba, Ogawa et al. 2005 ; Kavanagh, Dowd et al. 2004). Ce type de variations confère à cette bande protéique les propriétés d'un biomarqueur.

L'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle (PAGE et SDS-PAGE) nous ont permis de souligner plusieurs bandes protéiques présentant des variations quantitatives et qualitatives importantes permettant le recrutement (de certaines d'entre elles) comme protéines ayant les propriétés préliminaires de biomarqueurs de la pathologie étudiée. Cependant, cette analyse ne constitue qu'une première étape de l'analyse protéomique pour la validation d'un biomarqueur. Pour cela, notre étude doit être poursuivie par une deuxième dimension d'électrophorèse (séparation selon le pH) pour une meilleure résolution des bandes protéiques permettant ainsi une analyse plus sûre et reproductible.

### 3. Analyse du polymorphisme des protéines salivaires

#### 3.1 En condition non dénaturante et non réduite

##### 3.1.1 Les protéines salivaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 21 échantillons a permis de distinguer 10 bandes protéiques salivaires de haut poids moléculaire (Tableau 3).

La diversité des bandes protéiques est importante dans la zone 1 de haut poids moléculaire. Dans cette zone, la bande protéique 10 dont la mobilité est 40 mm est omniprésente ayant une fréquence de 95.23%, donc c'est la « protéine salivaire dominante » dans cette zone, suivie de la bande protéique 2 de mobilité 12 mm retrouvée chez 13 échantillons avec une fréquence de 61.90%. La bande protéique 1 de mobilité 10 mm est considérablement fréquente (52.38%). Des bandes protéiques moins fréquentes sont observées, telles que les bandes 3, 4, 6, 5 et 9 dont les fréquences sont 38.09%, 19.04%, 14.28%, 9.52% respectivement (Tableau 3). Les bandes protéiques de mobilité 7 et 8mm présentent la plus faible fréquence (4,76%).

**Tableau 3 :** Fréquences des protéines salivaires de HPM

Bandes protéiques	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	10	Témoin, E8, E14, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E23, E24	52.38
2	12	Témoin, E1, E2, E3, E4, E7, E8, E13, E15, E17, E18, E20, E23	61.90
3	15	Témoin, E1, E3, E7, E8, E13, E15, E17	38.09
4	18	E1, E18, E22, E24	19.04
5	21	E18, E22	9.52
6	22	1, E18, E22	14.28
7	26	E1	4.76
8	32	E20	4.76
9	34	E4, E19	9.52

10	40	Témoin, E8, E16, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E1, E2, E3, E4, E6, E7, E10, E13, E14, E15	95.23
----	----	--	-------

### 3.1.2 Les protéines salivaires de FPM

L'analyse de la diversité des protéines salivaires de faible poids moléculaire des 21 échantillons nous a permis de distinguer 8 bandes protéiques salivaires de mobilités différentes (Tableau 4).

Le polymorphisme des bandes protéiques est peu important dans la zone de faible poids moléculaire (Figure 18). Dans cette zone, la bande protéique 14 dont la mobilité est de 63 mm est présente dans 10 échantillons ayant une fréquence de 47.61 %, c'est la « protéine salivaire dominante » dans cette zone, suivie par la bande protéique 15 de mobilité 70 mm retrouvée chez 7 échantillons avec une fréquence de 33.33%. Les bandes protéiques 16 et 11 de mobilité 75 et 47 mm respectivement sont moins fréquentes (28.57%) suivies par la bande protéique 12 de mobilité 55 mm avec une fréquence de 9.52% (Tableau 2). Ainsi les bandes protéiques 13, 17 et 18 de mobilité 59 ,80 ,82 respectivement présentent la plus faible fréquence (4.76%).

**Tableau 4 :** Fréquences des protéines salivaires de FPM

Bandes protéiques	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
11	47	E1, E3, E4, E8, E19, E22	28.57
12	55	E3, E10	9.52
13	59	E1	4.76
14	63	Témoin, E1, E3, E4, E6, E7, E8, E13, E17, E19,	47.61
15	70	Témoin, E4, E7, E15, E17, E21, E23	33.33
16	75	E4, E15, E19, E21, E23, E24	28.57
17	80	E14	4.76
18	82	E14	4.76

### 3.2 En condition dénaturantes et non réduites

#### 3.2.1 Les protéines salivaires de HPM

La diversité des bandes protéiques est peu importante dans la zone 1 de haut poids moléculaire. Dans cette zone la bande protéique 1 dont la mobilité est de 8 mm est présente chez 15 échantillons ayant une fréquence de 83.33% donc c'est la « protéine salivaire dominante » dans cette zone, suivie de la bande protéique 8 de mobilité 36 mm retrouvée chez 13 échantillons avec une fréquence de 72.22%. La bande protéique 2 de mobilité 10 est moyennement fréquente avec 66.66%, suivie de la bande protéiques 4 de mobilité 15 mm avec une fréquence de 33.33%. La bande protéique de mobilité 34 mm a une fréquence de 22.22%. Les bandes protéiques 5 et 6 avec des mobilités respectives de 27mm et 31mm ont été détectées à une fréquence de 16.66 %. La bande protéique 3 ayant une mobilité de 13mm est la moins fréquente avec une fréquence de 5.55% (Tableau 5).

**Tableau 5 :** Fréquences des protéines salivaires de HPM

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons (E)	Fréquences (%)
1	8	Témoin, E1, E2, E3, E4, E6, E7, E8, E13, E15, E17, E20, E21, E23, E24	83.33
2	10	Témoin, E1,E4,E7,E8,E13,E15,E17,E21,E22,E23,E24	66.66
3	13	E4	5.55
4	15	E15, E17, E18, E22, E23, E24	33.33
5	27	E1, E2, E6	16.66
6	31	E1, E2, E6	16.66
7	34	E2, E17, E23, E24	22.22
8	36	Témoin, E1, E2, E4, E6, E7, E15, E16, E17, E18, E22, E23, E24	72.22

### 3.2.2 Les protéines salivaires de FPM

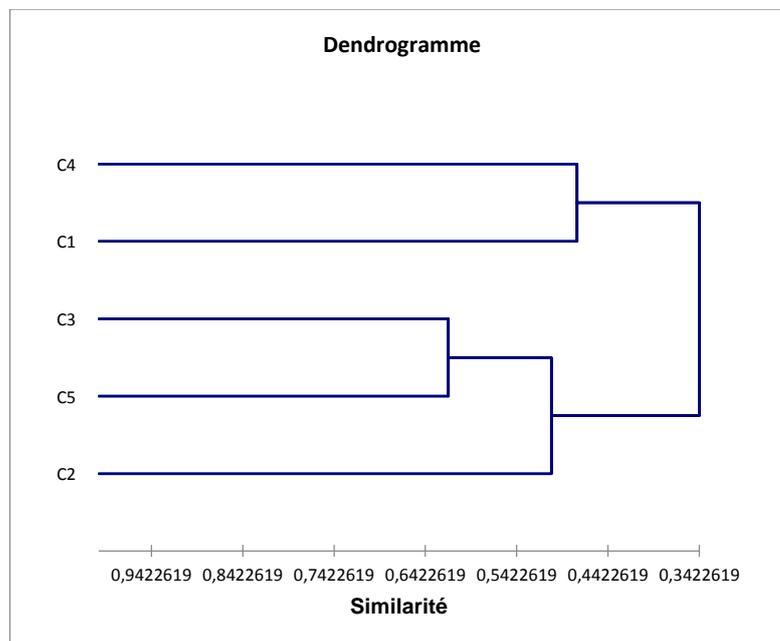
Dans la zone de faible poids moléculaire, la plus haute fréquence protéique observée est celle de la bande 15 de mobilité 61 mm retrouvée chez 9 échantillons avec une fréquence de 50%, ensuite viennent les bandes protéiques 17, 11 et 10 dont les fréquences sont de 38.88%, 33.33% et 27.77% respectivement. Les bandes protéiques 14 et 16 sont retrouvées chez 4 échantillons dont les mobilités respectives sont de 57 et 70 mm avec une fréquence de 22.22%. Les bandes protéiques 9 (39 mm), 12 (52mm) et 13 (54mm) ont une fréquence de 16.66% (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Fréquences des protéines salivaires de FPM

<b>Bandes</b>	<b>Mobilités (mm)</b>	<b>Echantillons (E)</b>	<b>Fréquences (%)</b>
9	39	E1, E2, E23	16.66
10	41	E1, E6, E18, E22, E23	27.77
11	49	E1, E2, E6, E18, E22, E23,	33.33
12	52	E1, E2, E23	16.66
13	54	E1, E18, E23	16.66
14	57	E15, E18, E22, E23	22.22
15	61	Témoin, E6, E7, E13, E15, E18, E21, E22, E23	50.00
16	70	E6, E18, E23, E24	22.22
17	74	Témoin, E1, E7, E15, E18, E23, E24	38.88



La population est divisée en 5 classes majeures à une distance d'agrégation de 0.665 (figure 14).

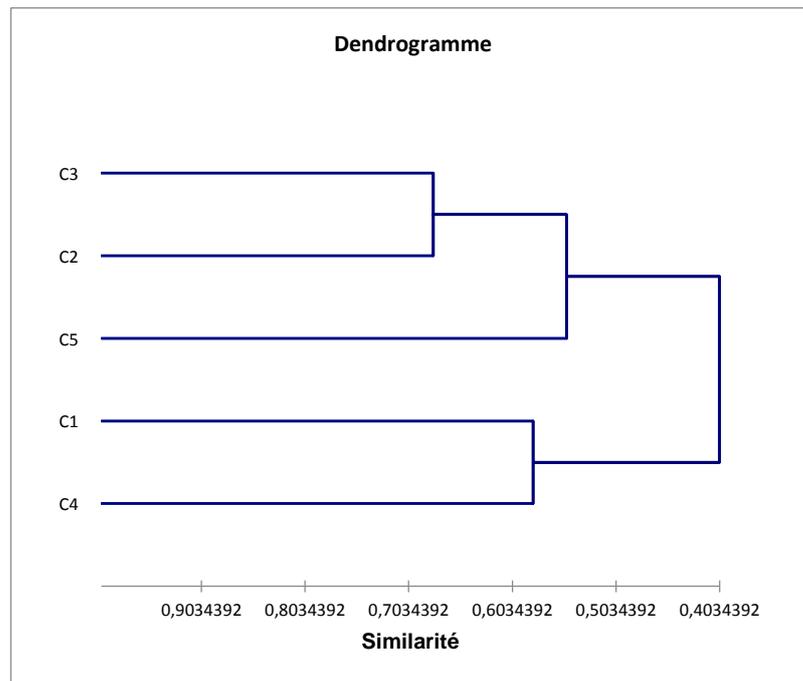


**Figure 13.** Répartition des classes basée sur la PAGE

Cette classification recrute le témoin dans une classe à part (classe 1) ce qui confirme le bon choix du sujet témoin dans cette étude. La deuxième classe est formée par 3 patients (17, 2 et 1). Ces derniers qui présentent des profils protéiques proches ne montrent pas des caractères en commun. La classe 3 est la classe majeure, elle comprend la plupart des patients (16, 7, 8, 21, 20, 10, 15, 6, 3, 4 et 14), elle-même est divisée en deux sous classes dont la deuxième comprend un seul patient (14). Ces patients présentent des degrés de similarité élevée. On note que la majorité de ces patients ont développé un AVC (accident vasculaire cérébral) avec un âge avancé. La quatrième classe est formée d'un seul individu, patient (13). La cinquième classe comprend les patients 19 et 18, ces deux derniers sont des femmes ayant un âge avancé (80 et 85 respectivement).

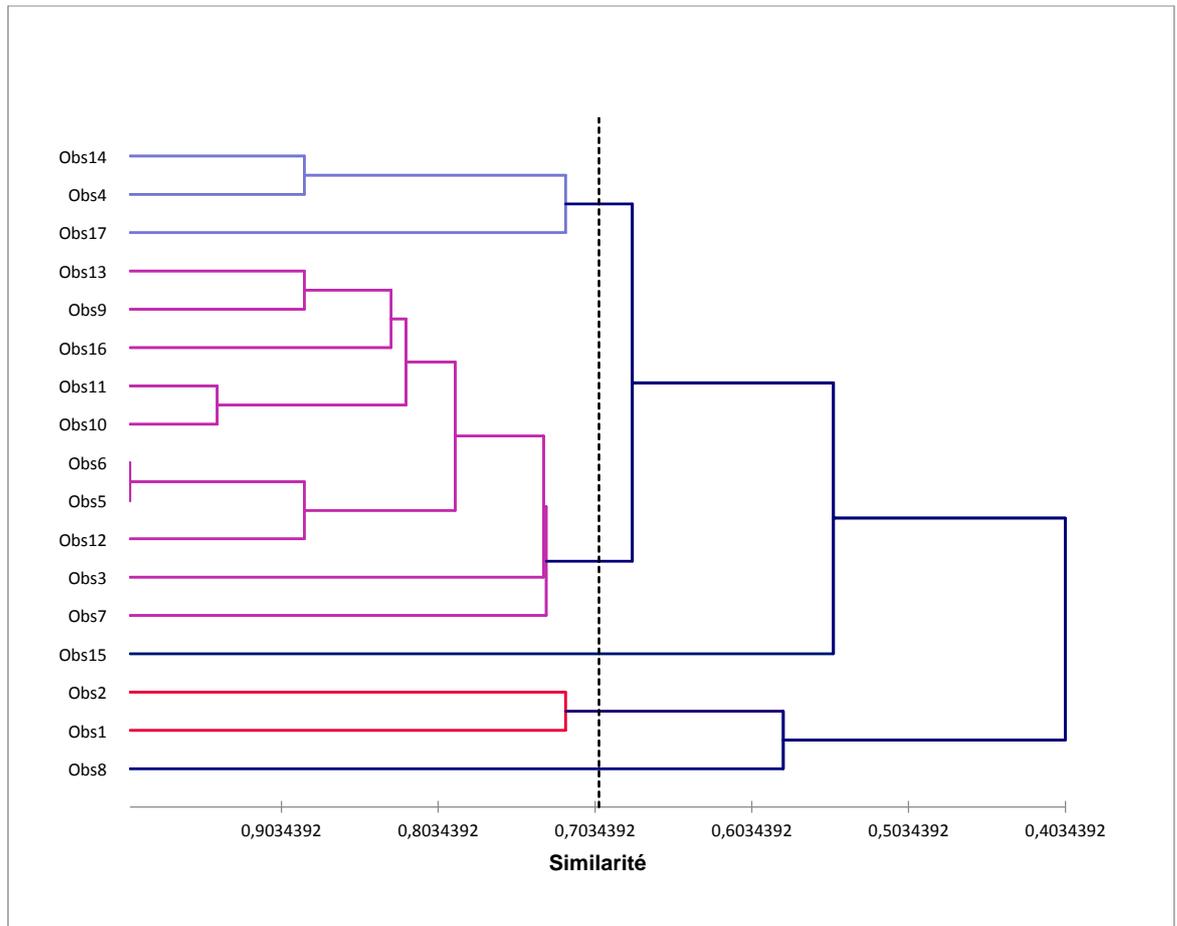
#### 4.2 Classification des protéines salivaires fractionnées par SDS-PAGE

L'analyse en cluster du protéome salivaire fractionné par SDS-PAGE divise la population d'étude en cinq grandes classes à une distance d'agrégation de 0.700 ce qui concorde avec la classification précédente (Figure 15).



**Figure 14.** Répartition des classes basée sur la SDS-PAGE

La première classe est composée de deux patients (1 et T) (Figure 16). La deuxième classe étant la classe majeure comprend l'ensemble de 9 patients (18, 13, 22, 16, 15, 6, 4, 17 et 20). Ces patients regroupés dans un même groupe ne présentent pas les mêmes phénotypes (tranches d'âges différentes, sexes différents.....). La troisième classe regroupe 3 patients (2, 3 et 23), ces derniers ont en commun le sexe et la tranche d'âge. La classification recrute le patient 8 dans une classe à part (classe 4), ce dernier présente un profil protéique différent toutefois, il ne présente pas des particularités phénotypiques par rapport aux autres patients. De même, la cinquième classe est formée par le patient 21 seulement et pas de particularités phénotypiques sont révélées pour ce patient.



**Figure 15.** Dendrogramme des protéines fractionnées par SDS-PAGE

L'âge et le sexe des patients ainsi que certains phénotypes communs et les pathologies associés ne semblent pas corrélés avec la classification hiérarchique basée sur la composition en protéines salivaires. Cependant ceci doit être renforcé par d'autres tests statistiques (Test de Mentel ou analyse en composantes principales par exemple) en tenant en compte le maximum de paramètre et un large éventail de patients.

### 5. Synthèse et discussion générale

La salive humaine abrite des protéines d'intérêts divers, et environ 30% des protéines sanguines sont également présentes dans la salive (Lazaro et al., 2015). Cela souligne que la salive peut être utilisée pour des applications cliniques, tout comme l'urine ou le sang. Un nombre important de protéines salivaires sont similaires à celles se trouvant dans le sang et dont le rôle a déjà été établi notamment dans les maladies d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson, les cancers du sein, du pancréas, cancer colorectal, des cancers de la cavité buccale, des infections par le virus du sida, ainsi que dans les deux types de diabète. Des recherches avaient aussi montré que les protéines de la salive guérissaient des plaies dans la cavité buccale, amplifiaient la voix, développaient le goût et détruisaient les bactéries et les virus (Zhang et al., 2016). Cependant, la traduction des découvertes de biomarqueurs salivaires en paramètres cliniques est entravée par la dynamique et la complexité du protéome salivaire.

Les résultats de l'analyse électrophorétique du protéome salivaire des patients atteints de candidoses buccales ont révélé la présence de plusieurs protéines d'intérêt. Toutefois certaines bandes protéiques étaient caractéristiques de patients particuliers. En outre, les résultats de la classification ascendante hiérarchique basée sur les matrices de similarité montrent la diversité importante entre les diagrammes protéiques des patients. Chaque patient présente un profil électrophorétique spécifique sauf de rares exceptions. Ces constats témoignent la dynamique, la variabilité et la sensibilité du protéome salivaire.

L'étude faite par Murr et al. (2017) a montré l'association du protéome salivaire avec quelques phénotypes. En effet, un grand nombre de protéines est associé avec le statut fumeur. De plus l'âge a une influence particulière sur la composition en protéines salivaires. En outre, cette dernière étude révèle l'influence de phénotypes communs (sexe, indice du poids corporel) sur les profils protéiques salivaires des sujets analysés. Ceci dit, ces facteurs doivent être pris en considération lors de l'investigation du protéome salivaire en association avec la maladie à étudier. Ceci confirme que certains facteurs ont influencé la classification des patients en fonction du protéome salivaire dans les deux conditions d'étude (PAGE et SDS-PAGE).

De plus, dans leur étude, Jasim et al. (2016) étudièrent le profil du protéome dans la salive entière parotidienne et sublinguale non stimulée et stimulée de dix patients sains examinés et caractérisés dans les mêmes conditions, en utilisant l'électrophorèse sur gel. Les résultats ont démontré que différentes méthodes de collecte fournissent des différences claires dans l'instantané du protéome salivaire et également dans la quantité relative de protéines spécifiques. La nature variable du protéome salivaire suggère que différentes approches

peuvent devoir être adoptées lors de l'étude de sa composition ou de son rôle possible en tant qu'indicateur d'états physiologiques particuliers. Ceci souligne l'importance de la cohérence lors de la collecte des échantillons de salive pour l'analyse protéomique.

On peut donc dire que la détermination de la variabilité du protéome salivaire est une condition préalable au développement de la salive en tant qu'outil diagnostique et pronostique dans des états physiologiques particuliers. Dans ce contexte, il est important que la variabilité technique induite par la collecte et le traitement des échantillons soit maintenue au minimum pour pouvoir évaluer de manière reproductible la variabilité dans les états de santé et de maladie.

En outre, les techniques de préparation, de traitement et de stockage des échantillons (température surtout) influencent la dynamique du protéome salivaire. Des études ont montré que la température ambiante favorise la protéolyse ainsi que l'activité protéolytique exogène est largement liée aux conditions de stockage (Esser et al., 2008). Dans notre analyse de profils électrophorétiques, la faible concentration ou l'absence de certaines bandes protéiques par rapport au témoin peuvent être interprétées, non seulement par la dégradation de certaines protéines salivaires par des enzymes lytiques de *Candida albicans* (protéolyse endogène), mais aussi par la protéolyse exogène liée aux conditions de stockage.

De plus, certaines conditions de la méthode de recueil (salive parotidienne et sublinguale, stimulée et non stimulée) affecte les sécrétions salivaires et par conséquent la composition en protéines salivaires (Benjamin et al., 2013).

Pour cela, nous croyons que des recommandations peuvent être faites en ce qui concerne l'échantillonnage de la salive pour assurer la qualité des futures études dans le domaine émergent de la protéomique clinique de la salive.

En perspectives de pouvoir utiliser la salive comme liquide de diagnostic ou de pronostic, il est nécessaire de comprendre :

(i) la variation biologique normale des biomolécules dans la salive (par exemple, variation diurne, variation intra-sujet et variations entre sujets, effets sur l'âge et le sexe).

ii) la variation biologique inter-individuelle des biomolécules dans la salive (choix de style de vie, régime alimentaire, médicaments, tabagisme, alcool et activité physique).

iii) les variations méthodologiques dues à l'échantillonnage, à la manipulation et au stockage de la salive ; Étant donné que le protéome salivaire est sensible à la fois aux facteurs extrinsèques et aux facteurs intrinsèques.

Ainsi, il faut tenir en compte, les variations diurnes des analytes, de l'âge, du sexe, etc. Il est également important de normaliser les méthodes de collecte de la salive pour satisfaire aux exigences d'analyse de routine. Par conséquent, nous suggérons que les méthodes utilisées dans un environnement de recherche s'alignent aussi étroitement que possible avec les exigences de l'application clinique.

Les études protéomiques salivaires ont répertorié une diversité remarquable de protéines et de modifications importantes. Cependant, la protéomique clinique de la salive est encore à un stade primitif, en particulier en ce qui concerne la traduction clinique.

**Conclusion**

### Conclusion

Ce travail a été effectué pour explorer le protéome salivaire des patients atteints de candidoses buccales et le comparer avec celui du sujet sain par application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelles, pour la recherche de protéines spécifiques pouvant avoir la propriété de biomarqueur pour le diagnostic de la maladie.

La méthode de séparation des protéines utilisée est celle de Laemeli (1970) modifiée par Singh (1991). Le choix de cette méthode était dans le but d'avoir une meilleure expression des protéines salivaires. Pour cela, la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisée dans deux conditions différentes : non dénaturantes et dénaturantes.

L'utilisation de ces critères pour le fractionnement des protéines salivaires nous a fourni des diagrammes satisfaisant et nous a permis de :

- Comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec celui du témoin et de remarquer que chacun des échantillons possède un profil protéique qui lui est propre et qui peut rassembler ou pas à celui d'un autre échantillon ou celui du témoin par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines.
- Révéler les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques de haut et de faible poids moléculaire.
- Distinguer les différences dans la composition protéiques des malades et du témoin.
- Identifier quelques bandes protéiques susceptibles d'être des biomarqueurs salivaires de la maladie.

En outre, le calcul des fréquences et la classification hiérarchique, ont permis d'apprécier la diversité des protéines salivaires dans les deux conditions.

L'analyse des gels a permis de déceler 19 bandes protéiques de mobilités différentes pour les protéines non dénaturées (9 bandes protéiques de HPM et 10 bandes protéiques de FPM). Dans les conditions dénaturantes, 17 bandes protéiques sont observées (8 bandes protéiques de HPM et 9 de FPM). Une nette différence est observée entre le profil du sujet sain et des patients. Dans les conditions non dénaturantes, 3 bandes protéiques ont présenté des différences qualitatives et quantitatives importantes (B1, B2 et B11). Dans les conditions dénaturantes, 2 bandes protéiques d'intérêt sont détectées (B1 et B8). Ces bandes sont les plus variables qualitativement et quantitativement et sont soit absentes ou présentes, d'intensité égale ou différentes par rapport à celles obtenues sur le profil du témoin.

Certaines protéines ne s'expriment que chez certains malades et sont absentes chez le témoin ; B7, B8, B17 et B18 dans la première condition, B14 et B16 dans la deuxième condition.

Les résultats de la classification ascendante hiérarchique basée sur les matrices de similarité montrent la diversité importante entre les diagrammes protéiques des patients. Chaque patient présente un profil électrophorétique spécifique sauf de rares exceptions. Ces constats témoignent la dynamique, la variabilité et la sensibilité du protéome salivaire. Dans ce contexte, il est impératif de tenir en compte certains facteurs lors de l'analyse du protéome salivaire, à savoir ; la cohérence lors de la collecte des échantillons, l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle, l'état nutritionnel, le statut fumeur, les pathologies associées....

L'application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais elle reste insuffisante pour diagnostiquer la maladie. Pour cela, nous envisageons l'emploi de l'électrophorèse bidimensionnelle pour une meilleure séparation et résolution des protéines d'intérêt. La poursuite de cette analyse par la caractérisation des protéines par spectrométrie de masse sera nécessaire afin d'identifier les protéines susceptibles d'être considérées comme des biomarqueurs potentiels de cette maladie.

**Références  
bibliographiques**

## Références bibliographiques

- **Acurio J., Celis C., Perez J. et Escudero C.** 2014. Acoustic parameters and salivary IL-6 levels in overweight and obese teachers, *J. Voice.*, 28 (5): 574-81
- **Adébiotech** (Maison de la chimie). 2009. Réflexion prospective autour des biomarqueurs. *Rapport*, Le pôle interministériel de prospective et d'anticipation des mutations économiques (PIPAME), France
- **Amerongen A. et Veerma E.** 2002. Saliva - the defender of the oral cavity, *Oral Dis.*, 8:12-22
- **Annette Murr, Christiane Pink, Elke Hammer, Stephan Michalik, Vishnu M. Dhople, Birte Holtfreter, Uwe Völker, Thomas Kocher et Manuela Gesell Salazar.** 2017. Cross-Sectional Association of Salivary Proteins with Age, Sex, Body Mass Index, Smoking, and Education, *J. Proteome Res*, 16 (6) : 2273–2281
- **Armand G Ngounou Wetie, Kelly L Wormwood, Laci Charette, Jeanne P Ryan, Alisa G Woods et Costel C Darie.** 2015, Comparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the salivary proteome of children with autism spectrum disorder, *J. Cell Mol Med.*, 19 (11): 2664-2678
- **Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL).** 2014. Candidoses. Rapport, Université Médicale Virtuelle Francophone, France
- **Baldo A., Mathy A., Vermout S., Tabart J., Losson B et Mignon B.** 2007. Les mécanismes d'adhérence des champignons responsables de mycoses superficielles, *Ann.méd.vét.*, 151: 192-199.
- **Belahcen E.** 2016. Candidoses buccales chez l'enfant, Thèse de Doctorat en Médecine, université Mohammed V – RABAT
- **Bendel C.** 2003. Colonization and epithelial adhesion in the Pathogenesis of Neonatal, *semin. Perinatol*, 27 (5):357-64
- **Benjamin L.Schulz1, Justin Cooper-White et Chamindie K. Punyadeera.**2013. Saliva proteome research : current status and future outlook, *Crit Rev Biotechnol.*, 33(3) : 246-259
- **Biomarkers Definitions Working Group.** 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, *Clin Pharmacol Ther.*, 69:89-95.
- **Bonnot J. et Pilons F.,** 2013, Chimiothérapie anticancéreuse et prise en charge bucco-dentaire, pratique bucco-dentaire, actualités pharmaceutique, 52 :49-52.
- **Botterel F., Chabasse D., Dardé M., Datry A., Guiguen C., Miégeville M., Bonnin A., Bourée P., Bouteille B., Bretagne S., Candolfi E., Chandénier J., Contet – Audonneau N., Danis M., Dardé M., Datry A., Degeilh B., Derouin F., Desoubieux Get Duhamel C.** 2016.candidose. In : parasitose et mycoses des régions tempérées et tropicales.3<sup>e</sup> édition. ANOFEL, pp. 311-317
- **Boutebba F.** 2015. Les glandes salivaires, Cours médecine, Laboratoire Histologie CHU, Constantine
- **Catalan M., Nakamoto T. et Melvin J.** 2009. The salivary gland fluid secretion mechanism, *J. Med Invest.*, 56: 192-196
- **Caumes E., Antoine M. et Sophie C.** 2008. Manuel de prise en charge des maladies de peau chez les personnes vivant avec le VIH en Afrique subsaharienne. Paris, PP 52
- **Caumes E., Chabasse E. Pierard et Gentilini M.** 2001. Atlas de dermatologie tropicale. (ed.) Janssen, Paris, PP. 118-119.

## Références bibliographiques

- **Cedard L., Jansens Y., Tanguy J., Zorn JR.** 1984. Radioimmunoassay of plasma and salivary progesterone during the menstrual cycle, *J Steroid Biochem.*, 20(1): 487-490
- **Chambard F.** 2009. Les candidoses cutanéomuqueuses : physiopathologie et conseils à l'officine, Thèse de doctorat, université Joseph Fourier
- **Charpentier S.** 2011. Les biomarqueurs. *Rapport*, Pôle de Médecine d'Urgences, CHU Toulouse, France.
- **Chattopadhyay A., Gray L., Lauren P., Caplan D., Gary D. et Shugars D .** 2004. Salivary secretory leukocyte protease inhibitor and oral candidiasis in human immunodeficiency virus type 1- infected persons, *Infect Immun*, 72(4): 1956-63.
- **Chen-Zi Zhang, Xing-Qun Cheng, Ji-Yao Li, Ping Zhang, Ping Yi, Xin Xu, et Xue-Dong Zhou.** 2016. Saliva in the diagnosis of diseases, *Int J Oral Sci*, 8(3): 133–137.
- **Cole GT., Seshan KR., Phaneuf M. et Lynn K T.** 1991. Chlamyospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice, *Can J Microbiol.*, 37: 637-646.
- **Cummings J., Ward TH., Greystoke, Ranson M. et Dive C.** 2008. Biomarker method validation in anticancer drug development, *Br J Pharmacol*, 153(4): 646-56.
- **Devoize L. et Dallel R.** 2011. Salivation, *Stomatol Chir Maxillofac*, 22 :1-18.
- **Dutt M., Lee KH.** 2000. Proteomic analysis. *Curr Opin Biotechnol*. 11(2): 176-179.
- **Eberlé F.** 2008. biomarqueurs génomiques : contribution des tests diagnostiques à la médecine personnalisée, *Bio tribune*, 27(1) :pp.8-15
- **Eggimann P., Garbino J. et Pittet D.** 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients, *Lancet Infect Dis.*, 3: 685-702
- **Eliasson L. et Carlen A.** 2010. An update on minor salivary gland secretions, *EUR J. Oral Sci.*, 118: 435- 442
- **El-Kirat-Chatel S.** 2010. Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions *Candida* – phagocytes ; Application à la caractérisation du gène *OLE2* codant une désaturase chez *C. lusitaniae*, Thèse Du doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux 2
- **Esser D., Alvarez-Llamas G., de Vries MP., Weening D., Vonk RJ et Roelofsen H.** 2008. Sample Stability and Protein Composition of Saliva: Implications for Its Use as a Diagnostic Fluid, *Biomark Insights.*, 3: 25–27.
- **Flavie C.** 2014. Impact de l'expression des - 1,2 mannosides pariétaux de *Candida albicans* sur la virulence, Thèse de doctorat, université Lille, France
- **Ganong W.** 2005. Les glandes salivaires et la salive. In. *Physiologie médicale*, De Boeck, pp. 464- 465.
- **Hadzibegović AD., Danić D., Prgomet D., Tićac R et Kozmar A.** 2012. Analysis of saliva pepsin level in patients with tracheoesophageal fistula and voice prosthesis complications, *Coll Antropol*, 36(2):93-7.
- **Hajer Jasim, Patrik Olausson, Britt Hedenberg-Magnusson, Malin Ernberg et Bijar Ghafouri.** 2016. The proteomic profile of whole and glandular saliva in healthy pain-free subjects, *Sci Rep*, 6: 39073.
- **Heinrich I. et Johannes Z.** 2014 .Salivary gland diseases in children, *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 13:Doc06.

## Références bibliographiques

- **Hirtz C., Chevalier F., Raingeard I., Egea J-C., Bringer J., Rossignol M. et Deville De Périère D.** 2005. Preliminary research for human salivary markers in type 1 diabetes, les cahiers de l'ADF., 18-19 pp. 4-9.
- **Janice M., Yoshizawa A., Christopher A., Schafer A., Jason J., Schafer B., James J., Farrell C Bruce J., Paster D., David T. et Wong W.** 2013. Biomarqueurs salivaires : vers de futurs services cliniques et diagnostiques, Clin Microbiol Rev., 26 (4) : 781-791.
- **Kaczor-Urbanowicz KE., Martin Carreras-Presas C., Aro K, Tu M., Garcia-Godoy F. et Wong DT.** 2016. Saliva diagnostics - Current views and directions, Exp Biol Med., 242(5):459-472
- **Kavanagh K. et Dowd S .** 2004. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential, Afr J Pharm Pharmacol., 56(3): 285-289.
- **Kefalides PT.** 1999. Saliva research leads to new diagnostic tools and therapeutic options, Ann Intern Med., 131(12) : 991-992
- **Kleinegger C., Stoeckel D. et Kurago Z.** Comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., 92(1): 62-67
- **Laemelli U-K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685
- **Lazaro A., Soares N., Sayeeda M. et Omana S.** 2015. Utilité clinique et diagnostique de la salive comme fluide diagnostique non invasif : une revue systématique, Biochim Med, 25 (2) : 177-192
- **Lennon Sarah,** 2014. Développements méthodologique en spectrométrie de masse et analyse protéomique pour la recherche de biomarqueurs de différents types de cancers, Thèse en chimie analytique, Université de Strasbourg
- **Li J. et Lemon CH .** 2015. Influence of stimulus and oral adaptation temperature on gustatory responses in central taste-sensitive neurons, J Neurophysiol., 113 (7):2700-2712
- **Lupetti A., Paulusma-Annema A., Welling M., Sensei S VanDissel J. et Nibbering P.** 2000. Candidacidal activities of human lactoferrin peptides derived from the N terminus, Antimicrob Agents Chemother., 44(12): 3257-3263
- **Mambrini A.** 2006. Nouveaux Dossiers d'Anatomie. (ed). PCEM Heure de France, pp.165
- **Mandel ID.** 1990. The diagnostic uses of saliva, J Oral Pathol Med., 19(3): 119-125
- **Marie L., Bruno G., Farzad T. et Elena P.** 2011. Les candidoses oropharyngées des personnes âgées, Ger Psychol Neuropsychiatr., 9 (1) : 21-8
- **Mathieu B.** 2013. Les candidoses chez l'immunodéprimé d'ordre secondaire, Thèses de doctorat, université de lorraine
- **Matsuo R.** 2000. Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity, Crit Rev Oral Biol Med., 11(2):216-29.
- **Mayer FL., Wilson D. et Hube B.** *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. 2013, Virulence. ; 4(2):119-128.
- **Million L., Piarroux R., Monod M. et Meillet D.** 2002. Physiopathology of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients, Médecine et maladies infectieuses, 32: 696-703.

## Références bibliographiques

- **Millsop J. et Fazel N.** 2016 .Oral candidiasis, *clin dermatol.*, 34 (4):487-94
- **Nanci Antonio.** 2012. Ten Cate's Oral Histology, (ed). Ebook, pp. 400
- **Niyonsaba F. et Ogawa H.** 2005. Protective roles of the skin against infection : implication of naturally occurring human antimicrobial agent's beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme, *J Dermatol Sci.*, 40(3) : 157-168
- **Oudhoff M., Bolscher J., Nazmi K. et Kalay H.** 2008. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay, *FASEB J off Publ Fed Am Soc Exp Biol.*, 22(11):3805-3812
- **Dartevelle P., Ehlinger C., Zaet A., Boehler C., Rabineau M., Westermann B., Strub J-M., Cianferani S., Haikel Y., Metz-Boutigue M-H. et Marban C.** 2018. D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections, *Sci Rep.* Volume 8, Article number: 9235
- **Pedersen A., Bardow A., Jensen S. et Nauntofte B.** 2002. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion, *Oral Dis.*, (8):117-129.
- **Pilly E.** 2010. chapitre infection fongiques ; muqueuse superficielles, ouvrage du collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales : In. *Maladie infectieuse et tropicales*, 22<sup>e</sup> Edition, pp. 450-456.
- **Pinel B., Cassou M. et Bensadoun R.** 2012. Candidose oropharyngée et radiothérapie, *SFRO.*, 16:222-229.
- **Pizzigallo A. et Giorgini F.** 2015. Giant pleomorphic adenoma of the parotid gland: an unusual case presentation and literature review, *Acta Otorhinolaryngol Ital.*, 35(4): 293–296.
- **Riou B.** 2012. Principales recommandations pour l'évaluation d'un biomarqueur. Rapport, Service d'accueil des urgences, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France .
- **Ruiz-Herrera J., Elorza Mv., Valentin E; et Sentandreu R.** 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity, *FEMS Yeast Res.*, 6:14-29.
- **Schmidt-Westhausen AM., Bendick C., Reichart PA. et Samaranayake LP.** 2004. Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics, *Mycoses*, 47: 435-441
- **Scully C. et El-Kabir M.** 1994. *Candida* and Oral Candidiasis: A Review, *Crit REV Oral Dbiol med.*, 5(2):125-157
- **Singh N-K., Shepherd K-W. et Cornish G-B.** 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of gluteninJ, *Cereal.Sci.* 14: 203-208
- **Sudbery P., Gow N. et Berman J.** 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*, *Trends Microbiol.*, 12:317-324
- **Sweet SP., Denbury AN. et Challacombe SJ.** 2001. Salivary calprotectin levels are raised in patients with oral candidiasis or Sjögren's syndrome but decreased by HIV infection, *Oral Microbiol Immunol.*, 16(2):119–123
- **Szpirglas H. et Benslama L.** 1999. *Pathologie de la muqueuse buccale*, (ed.), Elsevier, Paris, pp. 308
- **Urs M. , Roberto L., Katja E. et Ulrike E. .** 2015. Alpha-Amylase Activity in Blood Increases after Pharmacological, But Not Psychological, Activation of the Adrenergic System, *PLOS One.*, 10 :( 6)
- **Vidailhet B., Robin O., Polo A., Bravetti Pet Mahler P.** 2008. Salivation. *Médecine buccale.* 3(1):1-8

## *Références bibliographiques*

- **Whiteway M. et Bachewich C.**, 2007. Morphogenesis in candida albicans, annu rev microbial , 61 : 529-53
- **Zohaib K., Zohaib S., Shariq N., Sohail- Zafar M., Paul D. et Almas K.** 2016. Dispositifs humains de collecte de salive pour la protéomique, Int J Mol Sci., 17 (6): 846

## ***Annexes***

**Annexe 1 : Solutions pour la préparation des gels****Solution mère d'acrylamide à 40%** (à préparer avec gants et masque)

- Acrylamide 40 g
- Eau distillée 100 ml

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

- Bisacrylamide 2 g
- Eau distillée 100 ml

**Solution stock de SDS à 10%**

- Sodium Dodécyl Sulfate 10 g
- Eau distillée 100 ml

**Solution d'APS (Ammonium Persulfate) à 5%** (à préparer extemporainement)

- APS 0.5 g
- Eau distillée 10 ml

**Tampon Tris HCl pH 8.8** (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

- Tris (hydroxyméthyl aminomethan) 60.57g
- Eau distillée qsp 400 ml
- Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant 8 à 10 ml
- Eau distillée qsp 500 ml

**Tampon Tris HCl pH 6.8** (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

- Tris (hydroxyméthyl aminomethan) 30.285 g
- Eau distillée qsp 200 ml
- Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant 19.5 ml
- Eau distillée qsp 250 ml

**Tampon de migration**

- Glycine 70.55 g
- Tris (hydroxyméthyl aminomethan) 15 g
- SDS 2 g
- Eau distillée qsp 5000 ml

**Solution de coloration** (pour deux gels)

- TCA 60% 100 ml
- Solution mère de Bleu de Coomassie R250 25 ml
- Eau distillée qsp 500 ml

**Solution mère de bleu de Coomassie R250**

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

- L'éthanol doit être mis en agitation dans l'éprouvette, avec un barreau aimanté. Le bleu de Coomassie est ensuite ajouté (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant). Laisser en agitation au moins deux heures, puis filtrer la solution.

**Gel de séparation (runing gel)**

- Acrylamide 40% 12,4 ml
- Bisacrylamide 2% 2,4 ml
- Tampon Tris HCl PH 8,8 15,2 ml
- SDS 10% 0,40 ml
- APS 1% 1ml
- TEMED 20ul

**Gel de concentration (stacking gel)**

- Acrylamide - Bisacrylamide (30 :0,8) 8,09 ml
- Eau distillée 13 ml
- Tampon Tris HCl (0,5M = 6,8) 5 ml
- SDS 10% 160 ul
- APS (20%) 100 ul
- TEMED 16 ul

## Annexe 2 : Dosage des protéines totales

## Réactif de Bradford

- Bleu de Coomassie G250 100mg
- Ethanol à 95% 50mL
- Acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à 85% 100mL
- dH<sub>2</sub>O Qsp 1L
  - A conserver à 4°C à l'abri de la lumière
- Solution mère (stock) de sérualbumine (BSA) à 2g/L (2mg/mL) obtenue à partir de solubilisation de BSA lyophilisée dissoute dans de l'eau distillée.
- **Préparation des dilutions de BSA**

	T 0,25	T 0,5	T 1	T 1,4
<b>BSA stock (2mg/ml)</b>	250 µl	500 µl	1000 µl	1400 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1750 µl	1500 µl	1000 µl	600 µl
<b>[BSA] mg/ml</b>	0,25	0,5	1	1,4

- **Préparation de la gamme étalon**

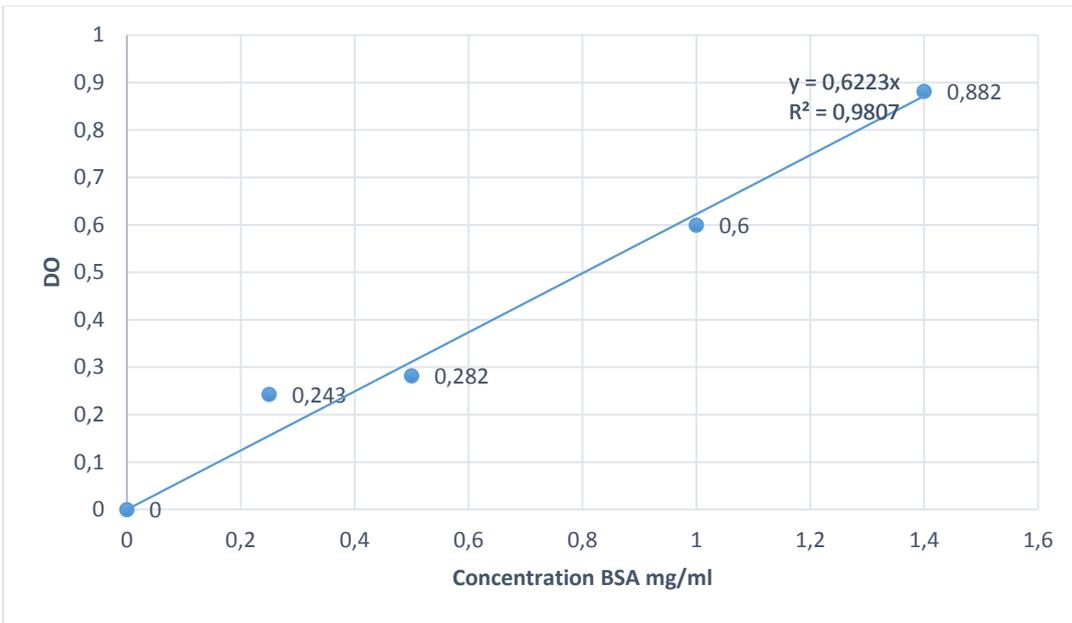
Nous avons utilisé 5 points pour tracer la droite

N° Tube	BSA des dilutions (mg / ml)	Réactif de Bradford (ml)
1 (Blanc)	0	3
2	0,25	3
3	0,5	3
4	1	3
5	1,4	3

- **La courbe d'étalonnage**

Concentration (mg/ml)	0	0.25	0.5	1	1.4
<b>DO</b>	0	0.192	0.333	0.63	0.882

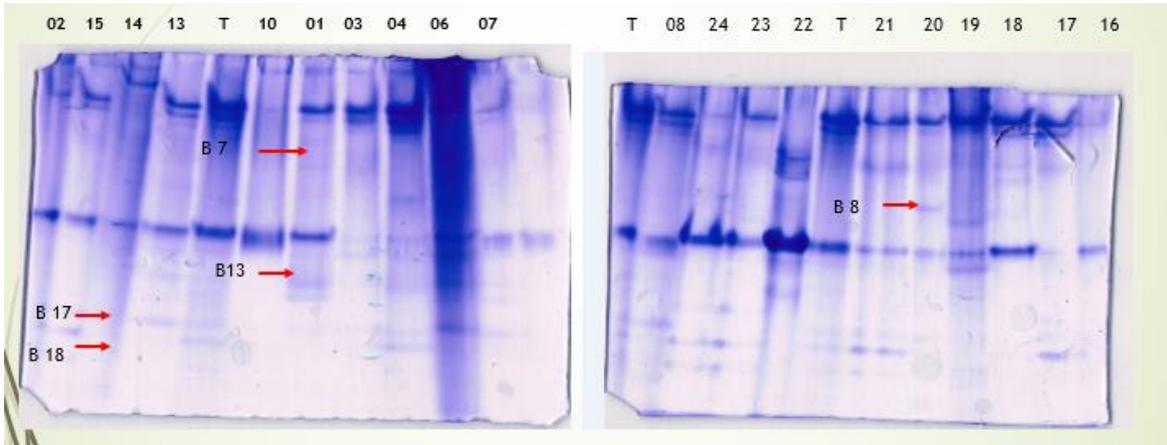
Courbe étalon représentant la variation de la concentration en BSA en fonction de l'absorbance.



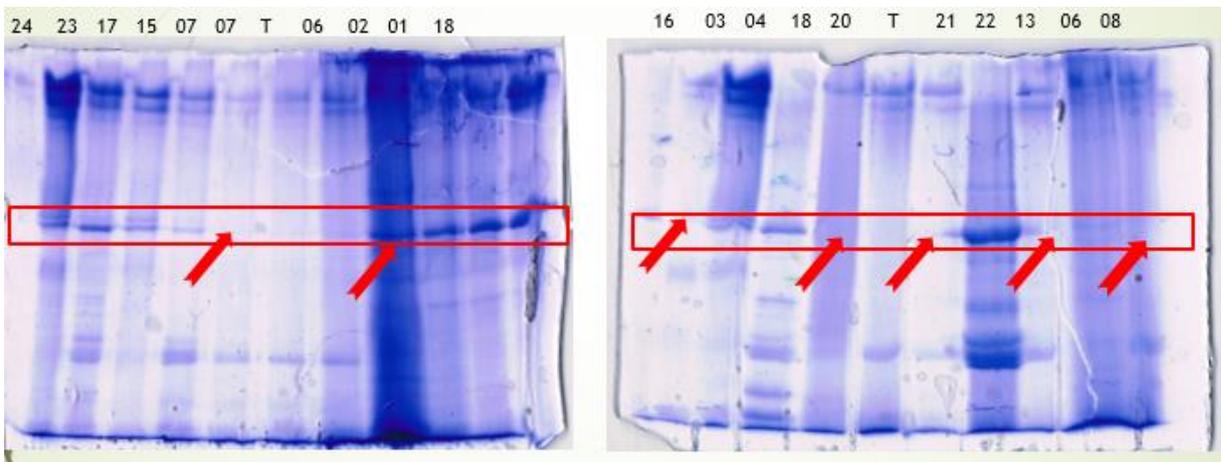
Gamme étalon de la quantité de BSA

Annexes 3 : profils électrophorétique

Page :



SDS-page :



**Exploration du protéome salivaire des patients atteints de candidoses buccales pour la recherche de biomarqueurs**  
**Réalisé par :**  
**BOUILOUT Yousra, LABIOD Djenat**

**Encadré par : Dr. MEDOURI A.**  
**Université Mohammed Seddik BENYAHIA- Jijel**  
**Année universitaire : 2017- 2018**

### Résumé

La candidose buccale est l'infection fongique humaine la plus répandue, induite par des levures du genre *Candida*. Cette pathologie est bien connue pour ses conséquences au niveau buccal et les modifications du flux salivaire ou encore de la composition protéique. Récemment, le protéome salivaire humain a fait l'objet de plusieurs études visant à mettre en évidence sa complexité au niveau de la composition en protéines. Afin de pouvoir appréhender les modifications salivaires au niveau protéique, nous avons comparé les profils obtenus par électrophorèse monodimensionnelle des protéines salivaires d'un sujet sain et de patients atteints de candidoses. L'analyse des profils a permis de mettre en évidence des différences remarquables entre patients et témoin. Cette étude nous a permis de mettre en évidence plusieurs bandes protéiques d'intérêts qui, après caractérisation, peuvent être considérées comme des biomarqueurs de cette pathologie. L'analyse en cluster des protéines salivaires montre la variabilité importante des diagrammes protéiques des patients. Ces constats témoignent la complexité, la dynamique, la variabilité et la sensibilité du protéome salivaire.

**Mots clés :** Candidoses buccales, salive, biomarqueurs, protéome, électrophorèse.

### Abstract

Oral candidiasis is the most common fungal infection induced by yeasts of the genus *Candida*. This pathology is well known for its consequences at the oral level and the changes in the salivary flow or the protein composition. Recently, the human salivary proteome has been the subject of several studies to highlight its complexity in terms of protein composition. In order to understand the salivary changes at the protein level, we compared profiles obtained by mono-dimensional electrophoresis of salivary proteins of a healthy subject and patients with candidiasis. The analysis of the profiles made it possible to highlight remarkable differences between patients and witness. This study allowed us to highlight several protein bands of interest which, after characterization, can be considered as biomarkers of this pathology. Cluster analysis of salivary proteins shows the large variability of proteins patterns in patients. These findings demonstrate complexity, dynamics and sensitivity of the salivary proteome.

**Key words :** oral candidiasis, saliva, biomarkers, proteome, electrophoresis

### الملخص

داء مبيضات الفم هو المرض الأكثر شيوعاً وينتج عن فطر من نوع *Candida*، يؤدي هذا المرض إلى تغيرات على مستوى الفم، إفراز اللعاب والتركيب البروتينية. لقد أصبح حديثاً البروتيوم اللعابي مصدر دراسات متعددة لتسليط الضوء على تعقيده من ناحية تكوين بروتيناته. من أجل القدرة على فهم هذه التغيرات على مستوى البروتين، قمنا بمقارنة مقاطع الهجرة الكهربية أحادية البعد لمجموعة اللبروتينات اللعابية للمرضى وشاهد غير مريض.

سمحت لنا هذه الدراسة بتمييز مجموعة أشرطة بروتينية مستهدفة إذ يمكن اعتبارها كمؤشرات بيولوجية لهذا المرض. يبين تحليل مجموعة البروتينات اللعابية للمرضى وجود تغير واضح على مستوى الرسوم البيانية. تؤكد هذه النتائج على تعقيد، ديناميكية وحساسية البروتين اللعابي

**الكلمات المفتاحية:** مبيضات الفم، اللعاب، مؤشرات بيولوجية، البروتيوم، الهجرة الكهربية

