

*République Algérienne Démocratique et Populaire*

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

**Université A. MIRA - Bejaïa**

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

*Département de Biologie Physico-chimique*

*Spécialité Biochimie Appliquée*



جامعة بجاية  
Tasdawit n'Bgayet  
Université de Béjaïa

**Mémoire de fin de cycle**

**En vue de l'obtention du diplôme**

**MASTER**

*Thème :*

**Criblage et identification de souches bactériennes isolées d'un  
microbiome intestinal des patients cancéreux**

**Présenté par :**

**AIT AISSI Cylia & OUCHIHA Wissam**

**Devant le jury composé de :**

**Mr D.ATMANI**

Président

**Mr A.GHIDOUCHE**

Encadreur

**Mme N.CHAHER-BAZIZI**

Examinatrice

**Année universitaire 2021/2022**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mon promoteur Mr A.GHIDOUCHE, pour sa disponibilité, son aide précieuse et ses conseils avisés durant la réalisation de mon travail de fin d'études. Merci pour le temps consacré aux corrections de ce travail.*

*A mes parents qui sans eux je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci d'avoir continué de croire en moi toutes ces années malgré les difficultés.*

*A mon père AIT AISSI AZEDDINE et ma mère BOUSSEKINE NABILA avec tous mes sentiments de respect, d'amour, de gratitude et de reconnaissance pour tous les sacrifices déployés pour m'élever dignement et assurer mon éducation qui m'ont soutenue tout au long de mes études.*

*A mon cher mari SADAT SOFIANE pour tout l'encouragement, le respect et l'amour qu'il m'a offert, je lui dédis ce travail, qui n'aurait pas pu être achevé sans son éternel soutien et optimisation.*

*A ma chère grand-mère paternelle KEBBI DAOUIA que ce modeste travail soit l'expression des vœux qu'elle n'a cerce de formuler dans sa prière.*

*A la mémoire de mon grand-père maternel BOUSSEKINE AHMED qui a toujours souhaité que je réussisse dans mes études. Je prie le tout puissant ALLAH pour le repos se son âme, amen!*

*A mes amis rencontrés au cours de mon cursus pour tous les bons moments passés.*

*A tous ceux qui me sont chers...*

**AIT AISSI Cylia**

***Je dédie ce travail;***

*En tout premier lieu, je remercie « le bon DIEU » tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.*

*A mes très chers parents, OUCHIHA Azddine et BAHFIR Souad, qui étaient toujours là pour moi et qui sans eux je n'en serais pas là aujourd'hui, et pour avoir toujours été à mes côtés dans les moments difficiles « pour leur disponibilité, encouragements et soutien ».*

*Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts, pour m'avoir donné le courage et la force tout au long de mes études, vous êtes ma source de joie et de fierté.*

*Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier.*

*Merci pour votre amour inconditionnel.*

*Pour lesquelles je souhaite une longue vie, pleine de bonheur et santé.*

*A ma petite sœur Chanaz pour son encouragement et son soutien.*

*Pour laquelle je souhaite la réussite dans ses études et dans sa vie privée.*

*A la mémoire de ma grand-mère maternel KICHOU Khadidja qui a toujours souhaité que je réussisse dans mes études.*

*Que DIEU les accueille dans son infinie miséricorde.*

*A tous ceux qui me sont chers...*

**OUCHIHA Wissam**

## *Remerciement*

*On tenait à remercier ;*

*Mr A.GHIDOUCHE: Pour son encadrement et ses conseils.*

*Melle M.TALBI: De l'aide, du soutien, de la patience, de la confiance qu'elle a pu nous accorder et d'avoir mené pleinement le rôle de Co-encadreur.*

*Mr D.ATMANI: Pour avoir accepté de présider le jury de cette soutenance.*

*Mme N.CHAHER-BAZIZI: Qui a bien voulu examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont également à l'endroit de tous les enseignants chercheurs du département de Biochimie Physico-chimique pour la qualité de leurs enseignements tout au long de notre cycle.*

# *Sommaire*

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	1
<b>Chapitre I</b> .....	2
1. Le microbiote intestinal.....	2
1.1 Le microbiote humain.....	2
1.2 Le microbiote intestinal, définition, rappels.....	2
1.3 Composition du microbiote intestinal.....	3
1.4 Résilience intestinale.....	5
2. Les différentes actions du microbiote.....	6
2.1 Fonctions physiologiques.....	6
2.1.1 Métabolique.....	7
2.1.2 Protection.....	7
2.1.3 Barrière.....	7
2.1.4 Immune.....	7
2.2 Lien entre dysbiose et maladies.....	7
3. Influence des facteurs environnementaux sur le microbiote.....	8
3.1 Césarienne/voie basse.....	8
3.2 Allaitement.....	9
3.3 Environnement.....	9
3.4 Autres facteurs influençant.....	9
<b>Chapitre II</b> .....	10
1. Définition et anatomie de colon.....	10
2. Définition du cancer colorectal.....	10

3. Incidence et mortalité.....	11
4. Facteurs de risques.....	11
5. Symptômes et diagnostics.....	11
<b>Matériel et méthode.....</b>	<b>12</b>
1-Présentation des cas cliniques.....	12
1.1 Type de population d'étude.....	12
1.2 Recueil des données.....	12
1.3 Échantillons.....	13
2-Produits chimiques et appareillage.....	14
2.1 Solutions et réactifs.....	14
2.2 Matériels (verreries) et appareillage.....	14
3. Tests microbiologiques.....	14
3.1 Milieux de culture utilisés.....	14
3.2 Prélèvement et isolement des microorganismes.....	15
3.3 Dénombrement total sur boîte.....	15
3.4 Repiquage.....	16
3.5 Tests primaires d'orientation.....	16
3.6 Tests d'identification.....	17
3.6.1 Tests d'Identification Microgalerie (API 20E).....	17
3.6.1.1 Définition.....	17
3.6.1.2 Composition.....	17
3.6.1.3 Principe.....	17
3.6.1.4 Les différents tests dans l'API 20 E.....	17
3.6.1.5 Protocole d'utilisation.....	18

3.6.2 Tests d'Identification Macrogalerie classique.....	19
4-Analyse comparative.....	19
<b>Résultats et discussion</b> .....	<b>20</b>
1-Analyse microbiologique.....	20
1.1 Dénombrement des bactéries sur GN et PCA.....	20
2. Analyse des repiquages sur des milieux sélectifs.....	25
2.1 Repiquage sur milieu gélose Chapman .....	25
2.2 Repiquage sur Mac Conkey.....	26
2.3 Repiquage sur milieu EMB.....	27
2.4 Repiquage sur milieu BEA.....	27
3. Analyse des repiquages sur des milieux d'enrichissement.....	27
3.1 Repiquage sur gélose Columbia au sang du mouton frais.....	28
3.2 Repiquage sur gélose Columbia au sang du mouton cuit.....	28
4. Tests d'Identification API 20 E.....	29
5. Tests d'identification classique.....	29
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>32</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## *Liste des tableaux*

<b>N° tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Classification des bactéries intestinales (Exemples de composition taxonomique du microbiote)	<b>3 ,4 et 5</b>
<b>II</b>	Maladies liées à l'altération du microbiote intestinal.	<b>8</b>
<b>III</b>	Représentant quelques paramètres des patients.	<b>13</b>
<b>IV</b>	Représentant les caractéristiques des échantillons (les selles).	<b>13</b>
<b>V</b>	Représentant le dénombrement total d'Ech1.	<b>21</b>
<b>VI</b>	Représentant le dénombrement total d'Ech2.	<b>22</b>
<b>VII</b>	Photographie originale d'un dénombrement total sur boîte de deux échantillons de chaque dilution.	<b>23, 24 et 25</b>
<b>IX</b>	Représentant les résultats galerie API 20 E.	<b>29</b>
<b>X</b>	Représentant les résultats tests d'identification classique.	<b>30 et 31</b>



## *Liste des figures*

<b>N° Figures</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Composition du microbiote intestinal.	<b>5</b>
<b>2</b>	Evaluation de la composition intestinale au cours de la vie	<b>6</b>
<b>3</b>	Anatomie du gros intestin	<b>10</b>
<b>4</b>	Photographie originale d'un dénombrement total sur boîte.	<b>15</b>
<b>5</b>	Photographie originale d'une galerie API 20E des deux échantillons.	<b>18</b>
<b>6</b>	Photographies originales de deux galeries API 20E illustrant les différents virages de couleurs obtenus après incubation.	<b>19</b>
<b>7</b>	Photographies originales de dénombrement total sur boîte d'échantillon 1.	<b>20</b>
<b>8</b>	Photographies originales de dénombrement total sur boîte d'échantillon 2.	<b>21</b>
<b>9</b>	Photographie originales des résultats obtenus sue gélose Chapman.	<b>25</b>
<b>10</b>	Photographies originales des souches obtenues à partir des 2 échantillons.	<b>26</b>

<b>11</b>	Photographies originales des souches obtenues à partir des 2 échantillons.	<b>27</b>
<b>12</b>	Photographies originales des souches obtenues à partir des 2 échantillons.	<b>27</b>
<b>13</b>	Photographies originales illustrant les étapes de préparation de la gélose Columbia au sang frais.	<b>28</b>
<b>14</b>	Photographies originales illustrant les étapes de préparation de la gélose chocolat.	<b>28</b>
<b>15</b>	Photographies originales des souches obtenues à partir des 2 échantillons sur gélose chocolat.	<b>28</b>

## *Liste des abréviations*

<b>CCR</b>	<b>Cancer Colorectal.</b>
<b>Échantillons</b>	<b>Ech.</b>
<b>GN</b>	<b>Gélose Nutritive.</b>
<b>GSC</b>	<b>Gélose Columbia au Sang Cuit.</b>
<b>GSF</b>	<b>Gélose Columbia au Sang Frais.</b>

## *Liste des annexes*

**Annexe I.** Composition et intérêt des milieux de culture utilisés.

**Annexe II.** Tests primaires d'identification des souches bactériennes intestinales.

**Annexe III.** Test d'identification galerie.

## *Introduction*

L'apparition d'Homo Sapiens (il y a environ 40 000 ans) est le résultat d'une très longue évolution initiée 3,5 milliards d'années auparavant par celles des procaryotes, ensuite des eucaryotes uni puis pluricellulaires.

Notre environnement est donc essentiellement microscopique et présent sur toutes nos interfaces avec le milieu extérieur : peau, vagin, tube digestif... Les microbes qui résident dans ou sur le corps humain constituent le microbiote et leurs gènes le microbiome.

L'homme héberge ainsi 10 fois plus de microbes qu'il ne compte de cellules somatiques ou germinales, ce microbiome représentant une diversité génique 100 à 150 fois plus élevée que celle du génome humain.

Jusqu'aux années 2000, la composition de la flore intestinale était mal connue, les bactéries isolées par culture ne représentant que 20 à 30 % des bactéries du tractus digestif. Notre connaissance actuelle de la biodiversité du microbiote intestinal humain repose en grande partie sur l'évolution des techniques de biologie moléculaire [1].

Un déséquilibre des populations du microbiote intestinal engendre des conséquences fonctionnelles importantes. Une dysbiose de ce dernier est associée à de nombreuses pathologies: maladies inflammatoires chroniques intestinales, cancer colorectal, obésité, autisme ainsi qu'à des troubles neurocomportementaux [2].

Cette communauté de germes commensaux est constituée de bactéries, mais aussi de virus et de champignons. Seule une petite fraction est cultivable mais les progrès des techniques de séquençage à haut débit et des moyens d'analyse bioinformatique permettent aujourd'hui la caractérisation de ce microbiote et ont ainsi étendu l'éventail des microbes connus dans notre organisme et dans notre environnement.

Le microbiote humain est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière, formant, avec les autres organes humains, un hétéro-organisme ou super-organisme complexe [3]. Il est composé de près de 100 000 milliards de bactéries [4]. Mais sa composition n'est pas homogène et varie tout le long du tractus digestif [5].

# Synthèse bibliographique

## Chapitre I

### 1. Le microbiote intestinal

#### 1.1 Le Microbiote humain

Le microbiote représente l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement spécifique, notamment le corps humain ; il désigne les communautés de micro-organismes (bactéries, virus, champignons, archées...) qui transitent ou résident : [6].

- **Sur la peau** : le microbiote cutané, qui se nourrit de sébum et de cellules mortes.  
Ce dernier compterait environ un million de bactéries par centimètres carrés de peau.
- **Dans la bouche** : le microbiote bucco-dentaire.
- **Dans les voies respiratoires** : le microbiote pulmonaire.
- **Au niveau des organes génitaux** : le microbiote vaginal, avec de nombreux lactobacilles favorisant l'acidité du vagin.
- **Dans le tube digestif** : le **microbiote intestinal** compte environ 100.000 milliards de micro-organismes [7].

#### 1.2 Le microbiote intestinal, définitions, rappels

Le microbiote intestinal a une importance majeure dans la physiologie de l'être humain. En effet, les études des deux dernières décennies et les travaux sans précédent de « l'International Human Microbiome Project » ont montrées que la symbiose entre les anthérocytes et le microbiote intestinal intervenait dans de nombreux domaines physiologiques aussi larges que la digestion, l'immunité et la tolérance immunitaire, mais aussi l'angiogenèse et même le système nerveux et le génome [8].

Il compte à lui seul  **$10^{12}$  à  $10^{14}$  microorganismes** chez l'homme, et représente l'ensemble des microorganismes présent dans tous les microbiotes (niches écologiques) du corps, et environ 2 kg de notre masse corporelle [9].

Aujourd'hui il est considéré comme un organe à part entière, un organe immunitaire avec 60 à 70 % des cellules immunitaires ; et considérablement un **deuxième cerveau** avec 100 à 200 millions de neurones [10].

### 1.3 La composition du microbiote intestinal

Le tractus gastro-intestinal est composé de plus de **100 milliards** de micro- organismes.

La grande majorité de ces micro- organismes sont des bactéries **non pathogènes** ; la diversité de ces bactéries est très importante puisque l'intestin abriterait environ 160 espèces différentes dont seulement la moitié est commune d'une personne à une autre.

Il existe néanmoins un ensemble de bactéries communes à tous les individus répartis dans 15 à 20 espèces bactériennes distinctes

L'abondance des bactéries varie selon les compartiments du tractus, qui croît progressivement de l'estomac vers le côlon [11].

Le microbiote est variable qualitativement et quantitativement le long du tube digestif avec des densités bactériennes de  $10^3$  dans le duodénum,  $10^5$  dans le jéjunum,  $10^8$  dans l'iléon et  $10^{12}$  dans le colon. Le microbiote intestinal humain est habituellement décrit à partir de l'analyse d'échantillons de selles ; il est donc le reflet de la partie terminale du tube digestif et comprend 4 phylum principaux : [12].

**Tableau I.** Classification des bactéries intestinales (Exemples de composition taxonomique du microbiote intestinal chez l'homme) [13].

Phylum	Ordre	Famille	Genre	Espèces
<b>Actinobacteria</b>	Actinomycetales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	
	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
				<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	<i>Atopobium</i>	
<b>Firmicutes</b>	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
			<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium spp</i>
		Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>	<i>Roseburia intestinalis</i>
		Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus faecis</i>

	Veillonellales	Veillonellaceae	<i>Dialister</i>	<i>Dialister invisus</i>
	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
			<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus leei</i>
<b>Bacteroidetes</b>	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	
	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
				<i>Bacteroides vulgatus</i>
				<i>Bacteroides uniformis</i>
		Tannerallaceae	<i>Tannerella</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>
			<i>Parabacteroides</i>	<i>Alistipes finegoldii</i>
		Rikenellaceae Prevotellaceae	<i>Alistipes</i> <i>Prevotella</i>	<i>Prevotella spp</i>
<b>Proteobacteria</b>	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
			<i>Shigella</i>	<i>Shigella flexneri</i>
	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio intestinalis</i>
			<i>Bilophila</i>	<i>Bilophila wadsworthia</i>
	Campylobacteriales	Helicobacteraceae	<i>Helicobacter</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>Fusobacteria</b>	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>



<b>Verrucomicrobia</b>	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	<i>Akkermansia</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>

Le microbiote intestinal a une importance majeure dans la physiologie de l'être humain. En effet, les études des deux dernières décennies et les travaux sans précédent de « l'International Human Microbiome Project » ont montrées que la symbiose entre les anthérocytes et le microbiote intestinal intervenait dans de nombreux domaines physiologiques aussi larges que la digestion, l'immunité et la tolérance immunitaire, mais aussi l'angiogenèse et même le système nerveux et le génome [14].

Nous pouvons regrouper ces fonctions en 4 fonctions majeures dont certaines ne sont établies qu'après l'âge de 2 ans chez l'enfant suggérant qu'une maturation du microbiote est nécessaire [15].

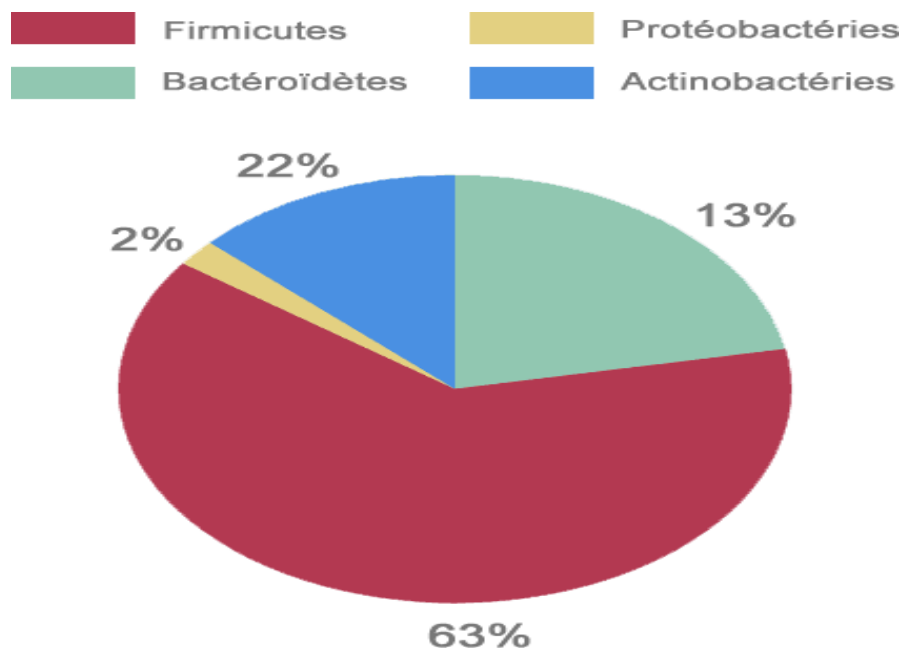


Figure 1. Composition du microbiote intestinal.

#### 1.4 La résilience intestinale

Notre flore intestinale se forme dès la naissance. Lors de l'accouchement, le microbiote se constitue à partir de la flore vaginale pour les naissances par voie basse, et à partir des micro-organismes de l'environnement pour les naissances par césarienne [16].

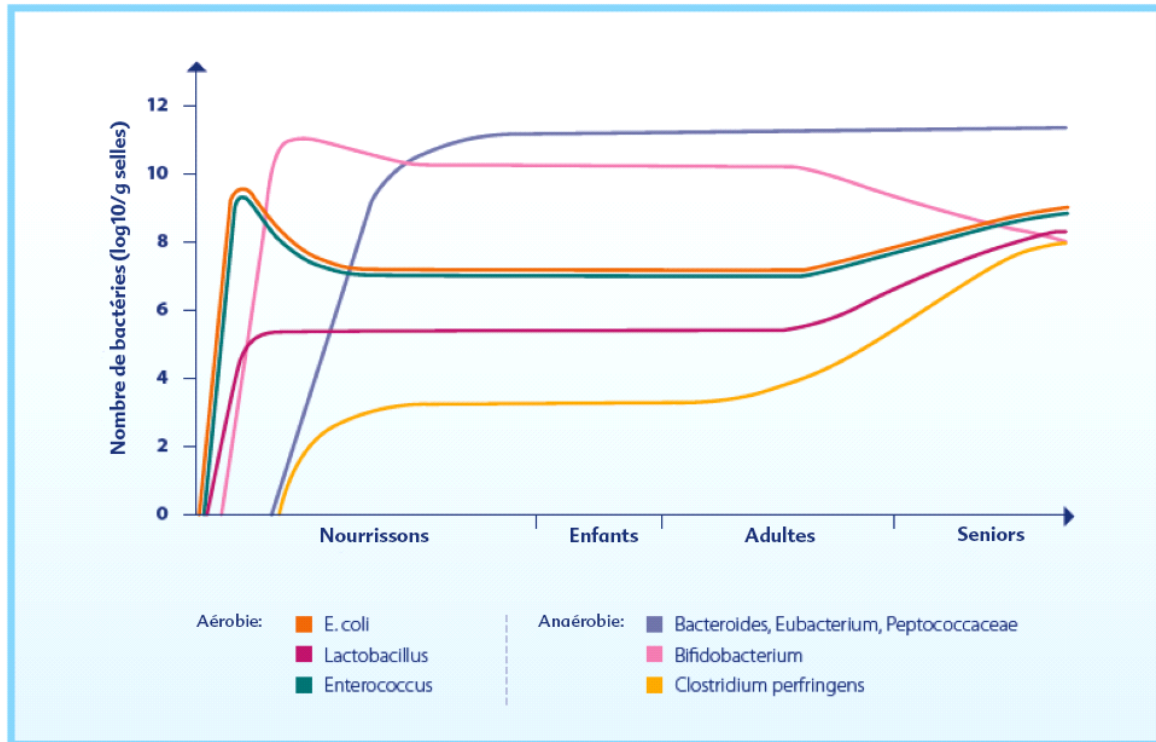


Fig. 1: Evolution de la composition du microbiote intestinal au cours de la vie

( modifié acc. to Schulze J et al. 2008)

## Figure 2. Evaluation de la composition intestinal au cours de la vie.

Des rétrocontrôles positifs et négatifs interviennent au cours du processus d'implantation et lors de changements pouvant être notamment causés par **le stress, la prise d'antibiotiques** ou **le type d'alimentation**. Ces systèmes de régulation tendent à restaurer l'écosystème suite à une perturbation. Cette capacité de retour à la normale est appelée **résilience**.

Elle peut être complète lorsque l'état d'équilibre est rompu transitoirement par une agression. A l'inverse, des perturbations répétées peuvent ne plus permettre ce retour à l'état d'équilibre: ces changements plus profonds sont ainsi responsables d'une dysbiose pouvant être la cause d'une pathologie [17].

## 2. Différentes actions du microbiote intestinal

### 2.1 Fonctions physiologiques

#### 2.1.1 Métabolique

- Différenciation et prolifération des cellules épithéliales intestinales.
- Synthèse des vitamines (vitamine K, folate, biotine).
- Absorption d'ions.

### **2.1.2 Protection**

- Production de facteurs antimicrobiens.
- Compétition avec le pathogène (nutriments, récepteurs).

### **2.1.3 Barrière**

- Jonctions serrées.
- Induction de sécrétion d'IgA.
- Induction de peptides antimicrobiens par l'hôte.

### **2.1.4 Immune**

- Développement du système immun. muqueux et général.
- Maturation immunitaire adaptative intestinale [18].

## **2.2 Lien entre dysbiose et maladies**

Une modification du microbiote, de sa composition mais aussi de sa dynamique structurelle et fonctionnelle, a été observée dans un certain nombre de maladies métaboliques et de système (infections, allergies, diabète, MICI, obésité) mais aussi dans les pathologies psychiatriques et comportementales et dans certains troubles fonctionnels intestinaux [19].

Le Tableau suivant recense les principales pathologies pour lesquelles des preuves tangibles de relation entre déséquilibre du microbiote intestinal et altération de l'état de santé de l'hôte ont été rapportées, principalement chez l'adulte. De nombreuses autres pathologies ont été étudiées ou sont encore en cours d'étude pour lesquelles un déséquilibre du microbiote pourrait avoir une influence [20].

**Tableau II.** Dysbiose intestinale associées à des pathologies et troubles fonctionnels [21].

<b>Maladies</b>	<b>Dysbiose intestinal</b>
<b>Obésité</b>	Diminution du rapport Bacteroidetes / Firmicutes.
<b>L'asthme infantile</b>	Absence d' <i>Helicobacter</i> gastrique et augmentation de la dominance du microbiote par <i>Helicobacter pylori</i> .
<b>Maladie inflammatoire intestinal (colite)</b>	Augmentation des entérobactéries.
<b>Maladie de crohn</b>	Diminution de la résilience du microbiote intestinal, réduction de la diversité microbienne et augmentation significative des actinobactéries et proteobactéries ainsi qu'une surexpression d' <i>Enterococcus faecium</i> chez les personnes atteintes.
<b>Maladies intestinales fonctionnelles</b>	Augmentation de <i>Veillonella</i> et <i>Lactobacillus</i> .
<b>Cancer colorectal</b>	Augmentation de <i>Fusobacterium nucleatum</i> et diminution des Bacteroidetes et Firmicutes.

### **3. Influence des facteurs environnementaux sur le microbiote**

#### **3.1 Césarienne / Voie basse**

La venue au monde du nourrisson est la première et la plus importante fenêtre d'exposition aux germes : c'est un moment critique et l'unique opportunité d'établir les bases d'un bon et stable microbiote intestinal [22].

Il est reconnu de nos jours que la colonisation intestinale du nouveau-né après passage vaginal est différente qu'en cas de césarienne [23].

Après accouchement par voie basse, les nouveau-nés acquièrent des communautés bactériennes proches du microbiote vaginal de leur propre mère, dominées par *Lactobacillus*, *Prevotella* ou *Sneathia* spp [24].

Les enfants nés par césarienne ont des communautés bactériennes similaires à celles trouvées sur la surface de la peau, dominées par *Staphylococcus* sp. *Corynebacterium* sp.

Et *Propionibacterium* spp [25].

### **3.2 Allaitement**

La nutrition influence également la flore intestinale. Ainsi celle-ci est dominée par les Bifidobactéries chez l'enfant nourri exclusivement au lait maternel, avec une répression des autres bactéries anaérobies [26].

Chez les bébés nourris avec une préparation pour nourrisson, ce sont plutôt les genres Bactéroïdes, Clostridium et Eubactérium qui deviennent dominants. Ces derniers sont des marqueurs prédictifs de l'absence de lait maternel dans l'alimentation du nouveau-né [27].

### **3.3 Environnement**

Les conditions d'hygiène à la naissance et au cours des premiers instants de vie jouent un rôle considérable dans l'implantation et la dynamique du microbiote intestinal [28]. Car la bactérie est d'installation tardive dans les pays développés comparativement aux pays en voie de développement [29].

La zone géographique où a lieu la naissance semble avoir une influence sur la composition précoce du microbiote des nouveau-nés âgés de 6 semaines [30].

### **3.4 Autres facteurs**

#### **a) Antibiothérapie**

La prise d'antibiotique est considérée comme un des plus puissants modulateurs de la composition du microbiote intestinal [31].

#### **b) Âge gestationnel**

L'âge gestationnel ou la durée de l'hospitalisation [32]. En effet, un enfant prématuré présente un retard d'implantation et un microbiote moins diversifié qu'un enfant né à terme.

## Chapitre II

### 1. Définition et anatomie du colon

Le colon ou grand intestin mesure en moyenne 1.5m pour un diamètre moyen de 7cm.

Il forme un cadre autour de l'intestin grêle, en bordure de la cavité abdominale.

Son rôle est de terminer la digestion de récupérer l'eau du chyme intestinal et d'évacuer les déchets résiduels vers le rectum.

Le colon se divise en plusieurs segments: Le colon ascendant ou droit; le colon transverse; le colon descendant ou gauche; le colon sigmoïde [33].

# Anatomie du gros intestin

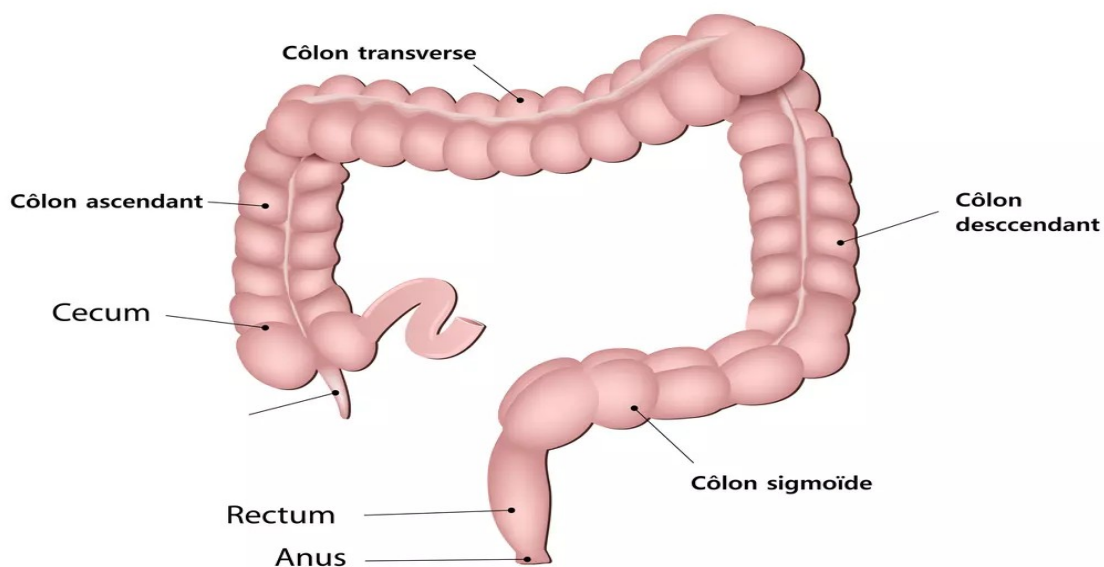


Figure 3. Anatomie du gros intestin.

### 2. Définition du cancer colorectal

Le terme de cancer colorectal regroupe l'ensemble des tumeurs et polypes qui peuvent se développer au niveau du colon et du rectum. En général, le cancer colorectal se développe à partir d'une tumeur bénigne non cancéreuse appelée polype adénomateux ou adénome.

### 3. Indice et mortalité

Le cancer colorectal est le 3<sup>ème</sup> cancer dans le monde chez les deux sexes confondus.

400.000 décès par cancer colorectal sont enregistrés chaque année. Ce type de cancer constitue de plus en plus un problème majeur de santé publique en Algérie [34].

L'Algérie enregistre près de 6.500 nouveaux cas du cancer colorectal (CCR), dont 3.500 chez les hommes et 3.000 cas chez les femmes, selon les registres du cancer de l'Institut national de santé publique (INSP).

Cette affection classée la première sur l'ensemble des types de cancer répandus en Algérie, de manière générale, arrive en première position chez l'homme suivi du cancer du poumon et en 2<sup>ème</sup> position chez la femme après le cancer du sein [35].

### 4. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risques augmentent la probabilité de développer un cancer colorectal.

Parmi ces facteurs, on trouve notamment:

- **L'âge** avec un diagnostic effectué en moyenne à 70 ans.
- **Le régime alimentaire** (viande rouge, alcool, manque de fibres ....).
- **Le mode de vie** (sédentarité, surpoids, tabagisme...).
- L'exposition à **des polluants et substances chimiques** (amiante).
- certaines **maladies chroniques de l'intestin** et les **antécédents familiaux** [36].

### 5. Symptômes et diagnostic

Le cancer colorectal, s'il n'est pas diagnostiqué et traité, entraîne progressivement des symptômes digestifs et abdominaux tels que des douleurs, des troubles du transit intestinal, la présence de sang dans les selles, ou un amaigrissement inexplicé...

A l'image de tous les cancers, un **diagnostic précoce** cancer colorectal augmente très fortement les chances de **guérison**.

- Douleurs abdominales.
- Troubles de transit intestinal.
- Présence de sang dans les selles.

- Anémies.
- Amaigrissement inexplicée.
- Altération de l'état de la santé générale.
- Fièvre persistant.
- Saignement du rectum dans le cas d'un cancer du rectum.

Si la maladie atteint un stade avancé sans traitement, une occlusion intestinale ou une perforation tumorale peuvent survenir, nécessitant une prise en charge médicale en urgence [37].

## **Matériels et Méthodes**

### **1. Présentation des cas cliniques**

#### **1.1 Type et population d'étude**

Il s'agit d'une étude portant sur 2 échantillons (Selles) atteints du CCR (de sexe féminin) âgés entre 50 et 70 ans, ayant une prise en charge au niveau du service d'oncologie médicale de l'établissement public hospitalier d'Amizour.

#### **1.2 Recueil des données**

Le recueil des données s'est fait de manière rétrospective à partir des dossiers de patients, à l'aide d'une fiche standardisée.

Pour la réalisation de ce travail, plusieurs variables ont été déterminés, ces variables concernent les données sociodémographiques tels que l'âge, le sexe...

Les principaux paramètres en rapport avec la qualité de prise en charge des patients ont été étudiés tels que le type et protocole de chimiothérapie appliqué, la répartition des patients selon le nombre de séances de chimiothérapie comme illustré en **Tableau III**.





**Tableau III.** Représentant quelques paramètres des patients.

Patient	Cod e	Sexe	Age	Site de cancer	Métastase	Traitement Anti-cancer	Infection	Diabète	Anémie	Chirurgie
1	Ech1	Féminin	64 ans	Sigmoïde	Non	3 Cures (CAPOX-Beva). 4 Cures (CAPIRI-Beva). 2Cures(CAPECITABINE).	NM	Non	Oui	Oui
2	Ech2	Féminin	66 ans	Sigmoïde	Non	1 Cure (CAPOX). 3 Cures (CAPOX-BENA).	NM	Oui	Non	Non

### 1.3 Échantillons : illustré en Tableau IV.

**Tableau IV.** Représentant les caractéristiques des échantillons (les selles).

Échantillons	Couleur	Texture	Présence de sang	Présence de parasite
 <b>Ech1</b>	Vert	Liquide	Non	Non
 <b>Ech2</b>	Marron	Semi-solide	Non	Non

## 1. Produits chimiques et Appareillage

### 2.1 Solutions et réactifs

Ethanol; eau physiologique; eau distillée; alcool; fushine; violet de gentiane; lugole; huile de paraffine.

## **2.2 Matériels (verrerie) et Appareillage**

Erlenmayer; éprouvette ; fiole jaugée; anse de platine; pipette pasteur; boîtes de pétri ; tubes à essai(en verre); micropipettes; embouts; lames et lamelles; pince en bois; mortier; spatule; verres de montres; trousse de dissection; bec bunsen; étuve réglée à 37°C; réfrigérateur réglée à 4°C ; bain marie; balance plaque; chauffeuse agitatrice; centrifugeuse; vortex; autoclave ; microscope optique; hotte bactériologique.

## **2. Tests microbiologiques**

Les analyses microbiologiques des échantillons ont été effectuées au laboratoire de génie biologique des cancers au sein du laboratoire de microbiologie, d'une manière stérile en respectant au maximum les conditions d'asepsies.

Les différentes analyses menées, visent à identifier les microorganismes plus précisément les bactéries présentes dans la flore intestinale des patients cancéreux.

### **3.1 Milieux de cultures utilisés**

La composition et l'intérêt cibles des milieux de culture sont présentés en **Annexe I**.

- Gélose nutritive.
- Gélose PCA.
- Gélose Columbia au sang frais.
- Gélose Columbia au sang cuit.
- Gélose Chapman.
- Gélose Mac Conkey.
- Gélose EMB.
- Gélose BEA.
- Bouillon nutritif.

### **3.2 Prélèvement et isolement des microorganismes**

Pour cette étude le travail a été mené sur une matrice qui est la matière fécale humaine.

Environ 10g d'échantillon fécal a été récupéré dans des boites de coproculture stériles et transportés dans une glacière, la durée de transport est de 40 à 50 min.

Sous une hotte de laboratoire afin de minimiser les contaminations par l'air, dissoudre 10g de chaque échantillon dans 90 ml d'eau physiologique stérile afin de réaliser les solutions mères. Pour d'homogénéiser le mélange, un passage au vortex est nécessaire.

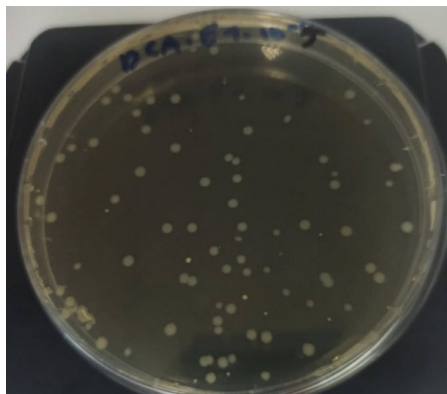
**NB:** Avant chaque manipulation, tout le matériel nécessaire est stérilisé soit à l'autoclave ou au four pasteur pour chaque échantillon.

Les solutions obtenues (solutions mères) ont étéensemencées sur boites en triple, contenant GN et PCA en prélevant 0.1ml de chaque dilution puis étaler avec un râteau et incubés dans une étuve à 37°C, en aérobiose, pendant 24 à 72 heures.

Après 27 heures d'incubation, l'ensemble des tests suivants ont été réalisés sur les boites de la matrice.

### 3.3 Dénombrement Total sur boite

Détermination le nombre probable de cellules bactériennes par le comptage direct à l'œil nu du nombre de colonies présentes au niveau de chaque boîte. Un exemple de quantification sur boite est illustré en **Figure 04**.



**Figure 4. Photographie originale d'un dénombrement total sur boîte.**

### 3.4 Repiquage

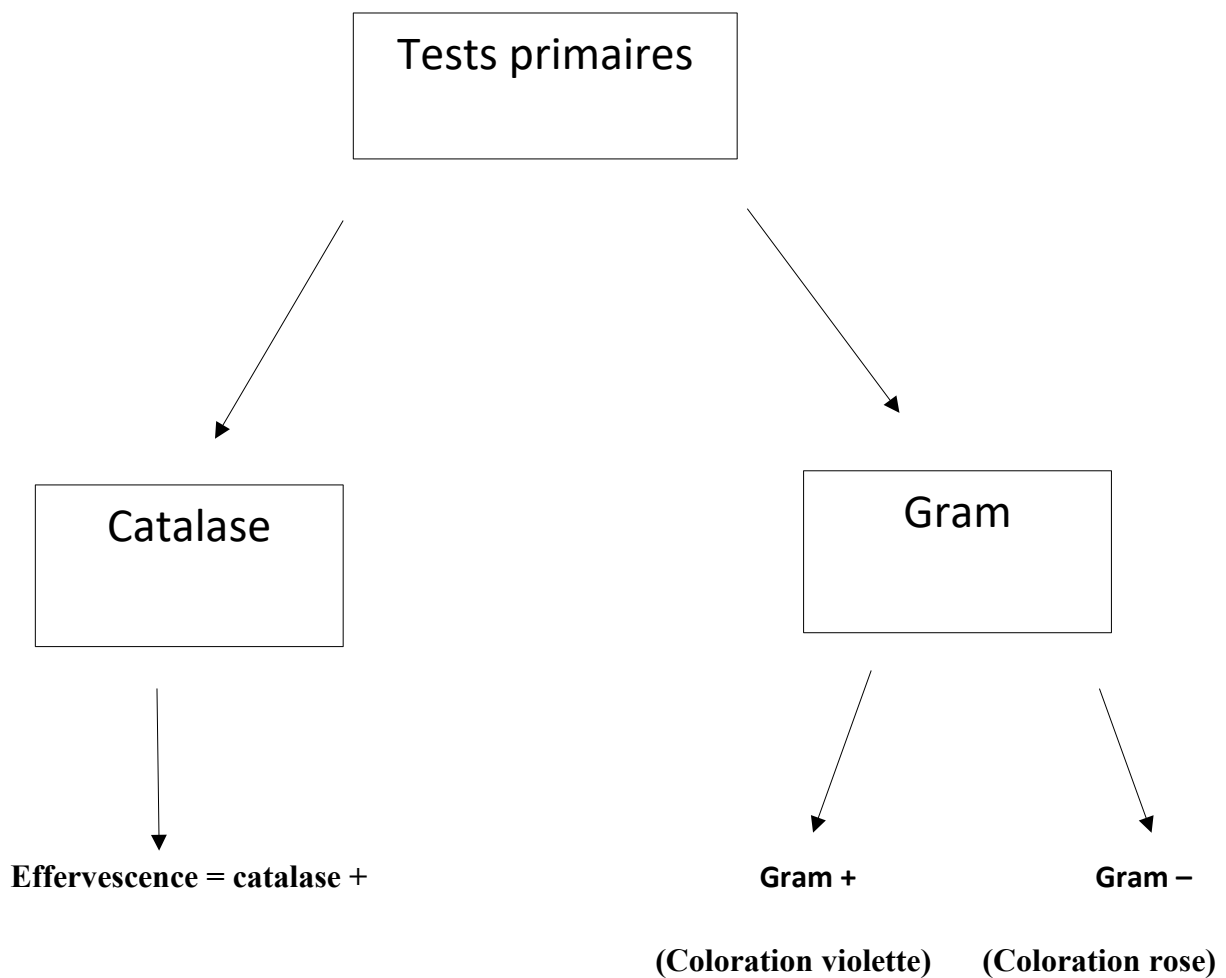
Un repiquage consiste en le dépôt d'une souche, récupérée de la culture bactérienne préparée

au préalable, à un nouveau milieu de culture. Afin d'obtenir une culture pure caractéristique à une espèce précise. Les boîtes sont en suites incubées à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37°C.

### 3.5 Tests primaires d'orientation

Des tests primaires: test de catalase et coloration de Gram, ont été effectués pour les colonies obtenues avec un aspect particulier et dominant pour chaque milieu de culture résumé en **Annexe II**.

#### Schéma général des tests primaires d'orientation réalisés



### 3.6 Tests d'Identification

L'identification du genre et de l'espèce d'une souche bactérienne doit se poursuivre par la

recherche de caractères biochimiques du métabolisme glucidique et protidique, en ensemençant une galerie d'identification : une "galerie" est un ensemble de milieux de culture, pouvant se présenter :

- soit en système miniaturisé (micro-galerie).
- soit en tubes (Macro-Galerie).

## **2.6.1 Tests d'Identification Macro-Galerie (API 20E )**

### **3.6.1.1 Définition**

La micro-galerie API 20E est une galerie miniaturisée et standardisée de tests Biochimiques (colorimétrique) permettant l'identification des Entérobactéries ainsi que d'autres bacilles Gram Négatifs. Elle se compose d'une gamme de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

### **3.6.1.2 Composition**

Dans la galerie **API 20E** la bande de plastique contient 20 mini-chambres (Puits) de test contenant des milieux déshydratés ayant des compositions chimiquement définies pour chaque test. Ils détectent généralement une activité enzymatique, principalement liée à la fermentation des glucides ou au catabolisme des protéines ou des acides aminés par les organismes inoculés.

### **3.6.1.3 Principe**

Une suspension bactérienne est utilisée pour réhydrater chacun des puits et les bandelettes sont incubées. Pendant l'incubation, le métabolisme bactérien produit des changements de couleur qui sont soit spontané, soit révélé par l'ajout de réactifs.

### **3.6.1.4 Les différents tests dans l'API 20E**

Cette Galerie permet la réalisation de 20 tests : ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H<sub>2</sub>S, URE, TDA, IND, VP, GEL, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA. Sont présentés en **Annexe111**.

### **3.6.1.5 Protocol d'utilisation**

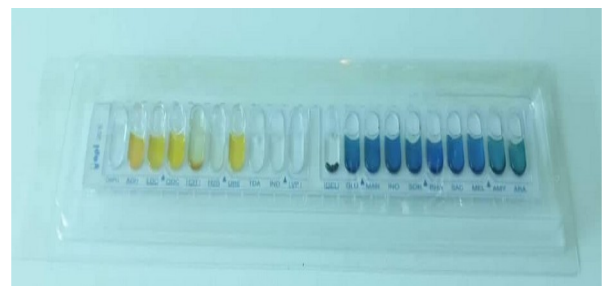
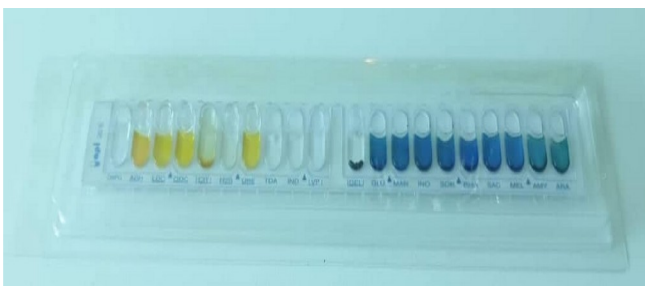
1- Réalisation d'une suspension bactérienne en cultivant une seule colonie isolée à partir

d'une culture pure dans l'eau distillée (5ml) puis vortexer afin d'homogénéiser la solution.

2- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Puis déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

3- Remplissage des microtubes de la galerie(**Figure5**) à l'aide d'une micropipette (Remplissage du tube et de la capsule des puits: CIT, VP, GEL. Remplissage du tube avec la solution bactérienne et avec de l'huile de paraffine de la cupule des puits afin de créer une anaérobiose: ADH, LDC, ODC, URE, H2S. Remplissage des tubes uniquement du reste des puits de la galerie).

4- Incubation du plateau à 37°C pendant 18 à 24 heures.



**Ech1**

**Figure 5. Photographie originale d'une galerie API 20E des deu**

**Ech2**

5- Après incubation à l'étuve, une lecture des virages des couleurs obtenus dans les différents puits et après ajout de réactifs (une goutte de réactif TDA; une goutte de réactif Kovacs, une goutte de réactif VP1 puis VP2). Comme illustré dans la **Figure 6** suivante.

Qui permet par la suite l'identification bactérienne à l'aide d'un catalogue analytique.



**Ech1**

**Ech2**

**Figure 6. Photographies originales de deux galeries API 20E illustrant les différents virages de couleurs obtenus après incubation.**

### **3.6.2 Tests d'Identification Macro-Galerie**

Les tests d'identification détectent des protéines spécifiques, certaines activités biochimiques des cellules cibles (par exemple l'activité enzymatique), fournissent d'importants résultats en un temps court, sont très économiques.

Parmi ces tests: Glucose, Indole, Uréase, H<sub>2</sub>S, VP, RM, Citrate...

## **4. Analyse comparative**

Cette présente étude repose sur l'identification de souches bactériennes isolées du microbiome intestinal des patients cancéreux et la comparaison entre les différentes souches des deux patientes.

## **Résultats et discussion**

### **1. Analyse microbiologique**

L'ensemble des analyses effectuées dans le cadre de la présente étude montre une diversité microbienne qualitative et quantitative sur les différents milieux, pour les deux échantillons.

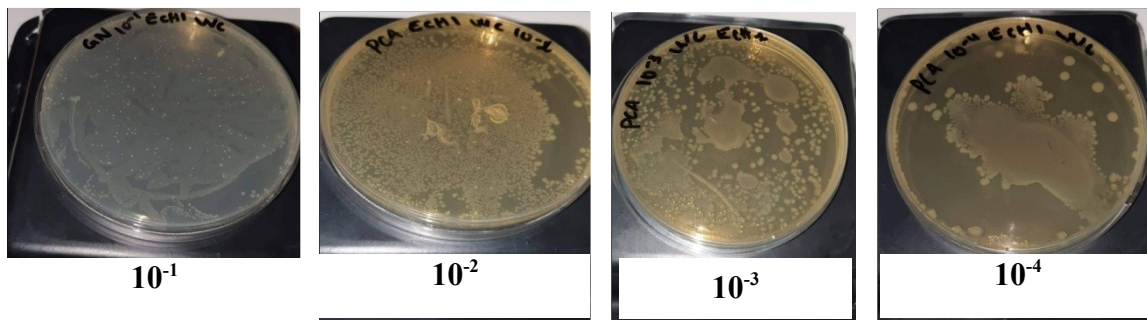
L'observation des boîtes de pétries réalisées sur les 2 échantillons en triple et sur les huit milieux de culture, dévoile une large gamme d'aspects de colonies de tailles variables (petites, moyennes et grandes, de couleur et de forme différentes ce qui confirme la diversité microbienne retrouvée pour les deux échantillons.

## 1.1 Dénombrement des bactéries sur GN et PCA

La GN et la PCA sont des milieux non sélectifs, permettent la culture de plusieurs germes n'ayant pas d'exigences particulières. Ceci permet d'avoir une vue d'ensemble sur les différents microorganismes cultivables colonisant le microbiote intestinal.

Le dénombrement sur GN et PCA s'est effectué sur la matière fécale après dilution (de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) et ensemencement sur boîte, en triple pour tous les échantillons.

➤ **Résultats des dénombrements d'Ech1** : Sont illustré en **Figure 7**.



**Figure 7. Photographies originales de dénombrement total sur boîte d'échantillon 1.**



➤ **Résultats des dénombrements d'Ech2** : Sont Illustré en **Figure 8**.

Figure 8. Photographies originales de dénombrement total sur boîte d'échantillon 2.



Suite aux résultats indénombrables obtenus par le dénombrement des deux échantillons de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-4}$  ; on a jugé nécessaire de prolonger le dénombrement jusqu'à  $10^{-8}$ .

➤ **Résultats des dénombrements d'Ech1** : Sont Illustré dans les **tableaux (V et VII)**.

Milieu de culture	GN	GN	GN	PCA	PCA	PCA	PCA	GN
<b>Dilution</b>	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
<b>Facteur de dilution</b>	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$
<b>N° de boîte et</b>								
<b>Boite1</b>	Ind	Ind	Ind	582	38 CN=	43 CN=	7	21 CN=
<b>Boite2</b>	Ind	Ind	Ind	507	174 CN=	17 CN=	2	19 CN=
<b>Boite3</b>	Ind	Ind	Ind	602	172 CN=	19 CN=	14 CN=	93 CN=

**Tableau V.** Représentant le dénombrement total d'Ech1.

$$N = c / (V \times 1,1 d)$$

Avec :

- N = concentration en nombre d'UFC par millilitres
- c = somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues.
- V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en millilitres.
- d = dilution correspondant à la première boîte retenue ; avec l'inoculum le moins dilué.

En suivant cette loi on a obtenus les résultats suivants :

$$\text{CN (boite1)} = 2.45.10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$$

$$\text{CN2 (boite2)} = 2.09.10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$$

$$\text{CN3 (boite 3)} = 1.21.10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$$

➤ Résultats des dénombrements d'Ech2 : Sont illustré dans les tableaux (VI et VII).

Tableau VI. Représentant le dénombrement total d'Ech2.

Milieu de culture	GN	GN	GN	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
Dilution	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Facteur de dilution	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$
N° de boîte et nombre d'UFC comptés								
Boite1	Ind	Ind	Ind	Ind	80	41	149	6
Boite2	Ind	Ind	Ind	Ind	108 CN=	82 CN=	40 CN=	10
Boite3	Ind	Ind	Ind	Ind	92 CN=	25 CN=	17 CN=	8

$$\text{CN1 (boite1)} = 9.27.10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$$


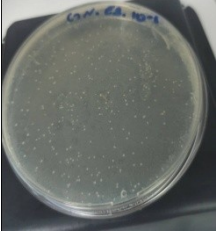


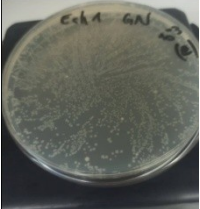
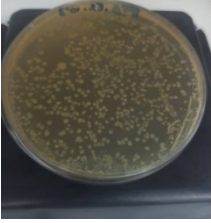


$$\text{CN2 (boite 2)} = 1.90.10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$$


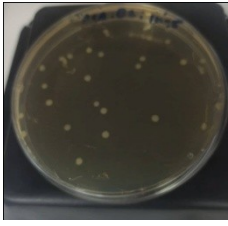
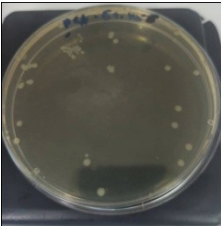

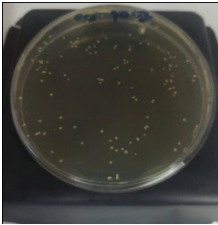
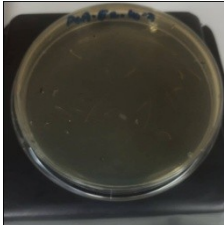
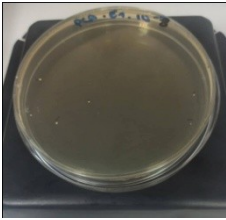
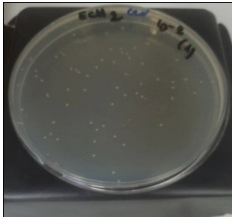
$$\text{CN3 (boite 3)} = 2.58.10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$$

Tableau VII. Photographie originale d'un dénombrement total sur boîte de deux échantillons

de chaque dilution.

<b>Les échantillons</b>	<b>Ech1</b>	<b>Ech2</b>
-------------------------	-------------	-------------

Les dilutions		
10 <sup>-1</sup>	 <p data-bbox="772 542 826 577">GN</p>	 <p data-bbox="1200 555 1254 591">GN</p>
10 <sup>-2</sup>	 <p data-bbox="772 990 826 1025">GN</p>	 <p data-bbox="1200 1003 1254 1039">GN</p>
10 <sup>-3</sup>	 <p data-bbox="772 1429 826 1464">GN</p>	 <p data-bbox="1168 1451 1222 1487">GN</p>
10 <sup>-4</sup>	 <p data-bbox="775 1899 849 1935">PCA</p>	 <p data-bbox="1193 1921 1267 1957">PCA</p>

$10^{-5}$	 <p>PCA</p>	 <p>PCA</p>
$10^{-6}$	 <p>PCA</p>	 <p>PCA</p>
$10^{-7}$	 <p>PCA</p>	 <p>PCA</p>
$10^{-8}$	 <p>PCA</p>	 <p>GN</p>

## 2. Analyse des repiquages sur des milieux sélectifs

Un milieu sélectif est formulé pour inhiber la croissance de certaines espèces bactériennes.

Exemple de milieux sélectifs: Chapman, Mac Conkey, BEA, EMB...

### 2.1 Repiquage sur gélose Chapman

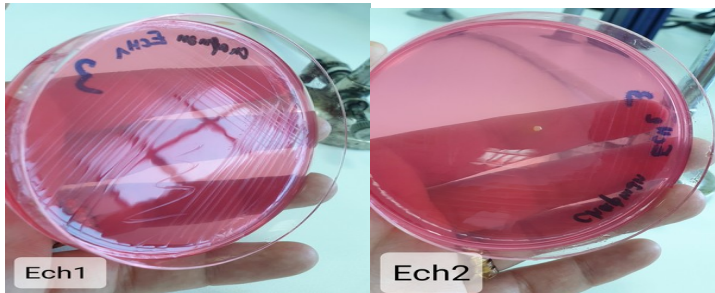


Figure 9. Photographie originales des résultats obtenus sur gélose Chapman.

- **Echantillon 1**

**Lecture :** aucune croissance sur ce milieu.

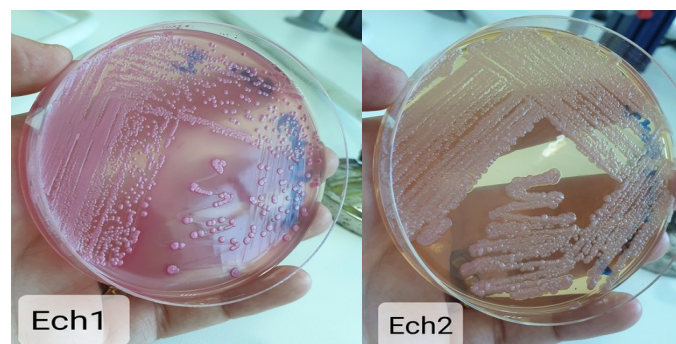
**Supposition :** inhibition des bactéries à Gram positif et négatif

- **Echantillon 2**

**Lecture :** colonie jaune.

**Supposition :** *Staphylococcus aureus*.

### 2.2 Repiquage sur milieu Mac Conkey



**Figure 10.** Photographies originales des souches obtenues à partir des 2 échantillons.

- **Echantillon 1**

**Lecture :** grandes colonies visqueuse de couleur rose foncé à pâle.

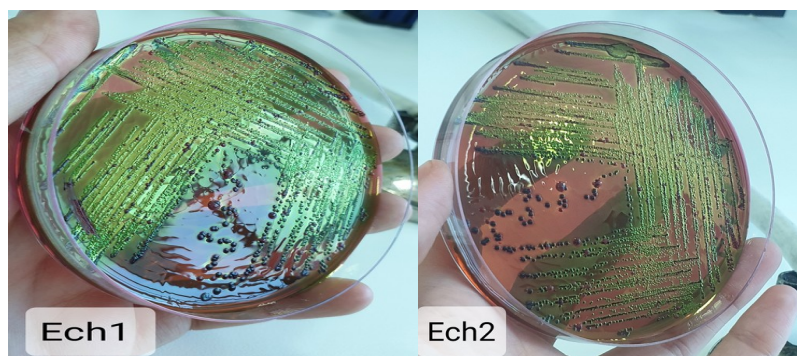
**Supposition :** *klebsiella*.

- **Echantillon 2**

**Lecture :** légère fermentation du Lactose, les colonies sont légèrement rosées à incolores.

**Supposition :** *Salmonella, Proteus, Yersinia, Pseudomona*.

### 2.3 Repiquage sur gélose EMB



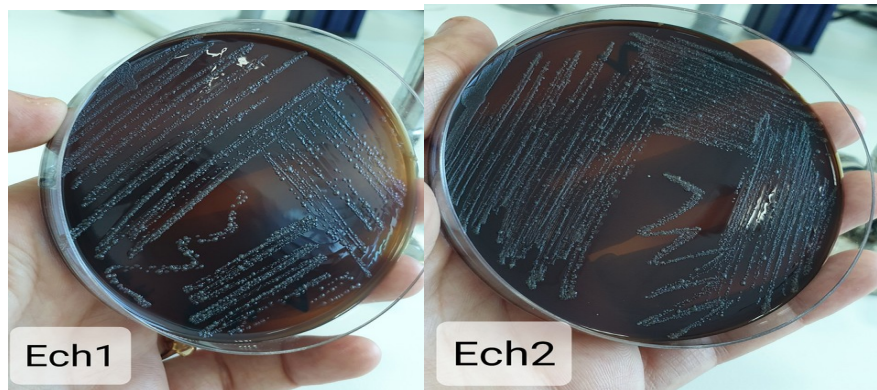
**Figure 11.** Photographies originales des souches obtenues à partir des 2 échantillons.

- **Echantillon 1 et 2**

**Lecture :** colonie de 2 à 3 mm, plates, production d'un reflet vert

**Supposition :** E.Coli.

### 2.4 Repiquage sur milieu BEA



**Figure 12.** Photographies originales des souches obtenues à partir des 2 échantillons.

- **Echantillon 1 et 2**

**Lecture :** Bonne croissance.

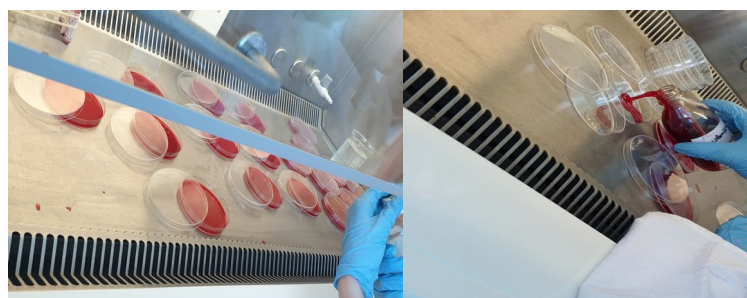
**Supposition :** *Enterococcus* ou *Escherichia coli*

### **3. Analyse des repiquages sur des milieux d'enrichissement**

Les milieux d'enrichissement sont utilisés pour favoriser la croissance d'un microorganisme particulier par rapport à d'autres.

#### **3.1 Repiquage sur gélose Columbia au sang du mouton frais**

La préparation de la gélose Columbia au sang frais de mouton d'effectue à 45°C, en mélangeant de manière homogène 5 à 10 % de sang de mouton défibriné stérile, après agitation, en évitant d'inclure des bulles d'air, puis répartir en boîtes de Pétri, permet de déterminer les réactions hémolytiques.

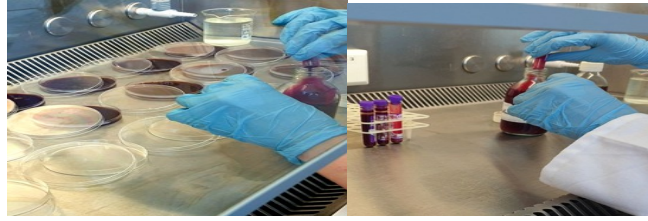


**Figure 13.** Photographies originales illustrant les étapes de préparation de la gélose Columbia au sang frais.

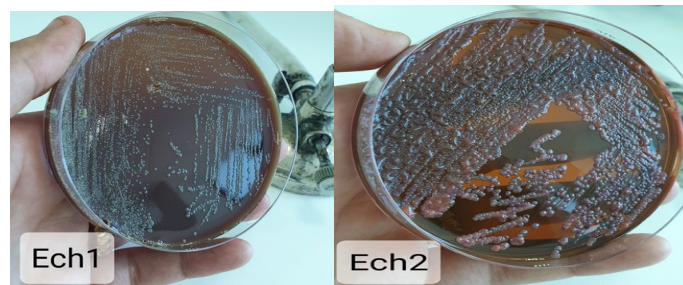
#### **3.2 Repiquage sur gélose Columbia au sang du mouton cuit**



La préparation de cette gélose s'effectue en chauffant le mélange au bain-marie environ 10 minutes à 80 °C en agitant tout le temps jusqu'à ce que le milieu devienne brun chocolat, répartir en boîtes de Pétri.



**Figure 14.** Photographies originales illustrant les étapes de préparation de la gélose chocolat.



**Figure 15:** Photographies originales des souches obtenues à partir des 2 échantillons sur gélose chocolat.

- **Echantillon 1 et 2**

**Lecture :** Une bonne croissance et pas d'hémolyse du milieu.

**Supposition :** *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*.

#### **4. Tests d'Identification API 20E**

Pour des raisons d'indisponibilité d'autres galeries API spécifiques à d'autres genres bactériens. L'identification des souches n'est effectuée que sur les bacilles gram négatifs.

L'identification de ces souches bactériennes a été effectuée à l'aide d'un site **UPBM** et d'un logiciel Excel, en entrant les résultats obtenus dans la feuille de calcul pour l'identification microbienne.

Les résultats révèlent que la souche obtenue chez la première patiente (Ech1) révèle être à 98% une **Klebsella pneumoniae spp pneumoniae**, et chez la deuxième patiente à 99.2 % une **Raoultellaornitholytica**. Ces résultats sont illustrés dans le **tableau IX**.

**Tableau IX.** Représentant les résultats galerie API 20 E.

Ech	O P G A	A D H	L D C	O D C	C I T	H 2 S	U R E	T D A	I N D	V P	G E L	G L U	M A N	I N O	S O R	R H A	S A C	M E L	A M Y	A R A	pro bab ilité	Résultat
Ech 1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	98.9 %	Klebsiella Pneumonie .
Ech 2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	99.2 %	Raoultella Ornithinolytica.

## 5. Tests d'identification classique

➤ Les résultats sont comme suit

**Tableau X.** Représentant les résultats tests d'identification classique.

Ech	Code	Oxyd	Cit	H <sub>2</sub> S	TDA	Ind	VP	Gaz	RM	Lac	Glu	Urée	Gram	Catal	Résultat
Ech1	E1C1	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	Proteus.sp
	E1C2	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	Enterobacter.sp
	E1C3	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	Escherichia coli
	E1C4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	Shigella. Sp
	E1C5	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	Salmonella. Sp
	E1C6	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	Cirrobacter.sp
	E1C7	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+

	<b>E1C8</b>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	Klebsiella sp
	<b>E1C9</b>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Escherichia coli
<b>Ech2</b>	<b>E2C1</b>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Klebsiella
	<b>E2C2</b>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	Escherichia coli
	<b>E2C3</b>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	Escherichia coli
	<b>E2C4</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	Shigella. Sp
	<b>E2C5</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	Klebsiella sp
	<b>E2C6</b>	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	Enterobacter.sp
	<b>E2C7</b>	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	Cirrobacter.sp
	<b>E2C8</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	Enterococcus sp
	<b>E2C9</b>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	Streptococcus sp
	<b>E2C10</b>	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	Pseudomonas sp

## **Conclusion et perspective**

Durant une période allant du 17 Mai au 3 juillet 2022, nous avons effectué aux niveaux des deux organismes, celui d'hôpital d'Amizour au niveau de service d'oncologie et celui de laboratoire de Génie Biologique des Cancers à la faculté de Médecine de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia (Campus Aboudaou) une récolte de données et d'échantillons qui s'agit de la matière fécale des patients atteint du cancer colorectal (CCR), Afin de réaliser ce modeste travail.

L'utilisation de la bactériologie classique nous a permis d'exploiter la flore fécale et d'identifier les différentes souches du microbiome intestinal des patients cancéreux.

Cette étude a été limitée en raison de plusieurs paramètres. Y compris une pénurie de ressources de solutions et de réactifs nécessaires pour élargir les champs d'identification.

Il est aussi important d'envisager d'effectuer l'étude expérimentale sur les deux sexes mâle

et femelle afin d'élargir les champs d'étude comparative.

Aussi, reproduire les résultats avec de plus grandes cohortes permettrait de découvrir la meilleure façon d'utiliser le microbiote tumoral, que l'on retrouve bel et bien dans le cancer intestinal, dans le but d'améliorer la réponse aux traitements actuels de cette maladie.

Néanmoins, l'ensemble des résultats obtenus après une analyse microbiologique classique de cette étude a permis de révéler plusieurs points :

⊗ Une diversité de souches bactériennes du microbiome intestinal chez des patients Cancéreux.

⊗ L'âge (plus de 50 ans) représente un facteur de risque d'atteinte du cancer colorectal.

Cette étude reste préliminaire car elle est limitée par le temps et l'espace. En perspective ces résultats doivent être par une série d'autres tests, beaucoup plus performants, En :

→ Menant une plus large étude avec un nombre plus élevé d'échantillons.

→ Effectuant une identification bactériologique d'une population saine.

→ Faire une comparaison quantitative et qualitative des germes isolés.

Puisque le cancer de colon est l'un des cancers causant le plus grand nombre de décès en Algérie, l'identification des espèces bactériennes retrouvées pourrait mener à des cibles thérapeutiques spécifiques.



## Références bibliographique

- [1] Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J-J, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. *Appl Environ Microbiol*. 1 nov 1999;65(11):4799-807.
- [2] Bourlioux, P. “Actualité Du Microbiote Intestinal.” *Annales Pharmaceutiques Françaises* ; 2014,
- [3] Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2 juin 2006;312(5778):1355-9.
- [4] Leclerc M, Juste C, Blottière H, Doré J. Microbiote intestinal : un univers méconnu. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 1 avr 2007;42:22-7.
- [5] service médico-scientifique PiLeJe. Le microbiote intestinal dans tous ses états [Internet]. [cité 24 nov 2018]. Disponible sur: <http://pro.groupepileje.fr/IMG/pdf/lettre-scientifique-microbiote-lsmicrobiote02-hd.pdf>
- [6] MARTEAU.P. Microbiote intestinal. *EMC-Gastro-entérologie* 2013;8(2):1-8 [Article 9-000-B-20]
- [7] <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-microbiote-12710/>
- [8] BIGACHE LARRIEU.M. Interet d'un établissement systématique précoce de la flore intestinale chez les nouveau-nés nés par sésarienne. *Un enjeu thérapeutique*. 2019.11.
- [9] Calenge, F., Martin, C., Le Floch, N., Phocas, F., Morgavi, D., Rogel-gaillard, C., & Quéré, P.. “Intégrer La Caractérisation Du Microbiote Digestif Dans Le Phénotypage de l’animal de Rente : Vers Un Nouvel Outil de Maîtrise de La Santé En Élevage ?” *INRAE Productions Animales* ; 2014, 27 : 209–222.

Denis, F., Ploy, M –C., Martin, C., & Cattoir, V. Microbiotes humains. Cattoir, V *Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles. Issy-Les-Moulineaux*. Paris, France. Elsevier Masson, 2016 : 5-12 (600p).

[10] Marteau, P. « Microbiote intestinal ». *EMC- Gastro entérologie* ; 2013, 8(2) : 1-8.

Denis, F., Ploy, M –C., Martin, C., & Cattoir, V. Microbiotes humains. Cattoir, V *Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles. Issy-Les-Moulineaux*. Paris, France. Elsevier Masson, 2016 : 5-12 (600p).

[11] Bourlioux, P. “Actualité Du Microbiote Intestinal.” *Annales Pharmaceutiques Françaises* ; 2014,

[12] Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J-J, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. *Appl Environ Microbiol*. 1 nov 1999;65(11):4799-807.

[13] Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G-A-D., Gasbarrini, A., & Mele M-C. “What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases.” *Microorganisms* ; 2019, 7 : 1- 22.

[14] Professeur Christine SILVAIN ,Professeur Fabrice PIERRE,Docteur Valérie SOHE; Docteur Valérie SOHET;Intérêt d’un rétablissement systématique précoce de la flore intestinale chez les nouveau-nés nés par césarienne. Un enjeu thérapeutique. 2019 Université de Poitiers Faculté de Médecine et Pharmacie THESE Poitiers 9

[15] Turnbaugh PJ, Stintzi A. Human Health and Disease in a Microbial World. *Front Microbiol* [Internet]. 16 sept 2011;2. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3174398/>



- [16] <https://www.euphytosegamme.fr/confort-intestinal/microbiote/microbiote-intestinal>
- [17] Landman C, Quévrain E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne*. 1 juin 2016;37(6):418-23.
- [18] BIGACHE LARRIEU.M.Interet d'un établissement systématique précoce de la flore intestinale chez les nouveau-nés nés par sésarienne.Un enjeu thérapeutique.2019.9.
- [19] CDU-HGE. Microbiote et immunité intestinale. In: LES FONDAMENTAUX DE LA PATHOLOGIE DIGESTIVE [Internet]. Editions Elsevier-Masson. 2014 [cité 18 déc 2018]. Disponible sur : [https://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap13\\_fondamentaux-pathologie-digestive\\_octobre-2014.pdf](https://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap13_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf)
- [20] Vos WM de, Vos EA de. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition Reviews*. 2012;70(s1):S45-56.
- [21] Cho, I., & Blaser, M-J. “The human Microbiome : At the Interface of health and disease.” *Nature Reviews Genetics* ; 2013, 13 : 260–270.
- [22] Francavilla R, Cristofori F, Tripaldi ME, Indrio F. Intervention for Dysbiosis in Children Born by C-Section. *ANM*. 2018;73(3):33-9.
- [23] Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clin Perinatol*. juin 2011;38(2):321-31.
- [24] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 juin 2010;107(26):11971-5.
- [25] Biasucci G, Benenati B, Morelli L, Bessi E, Boehm G. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr*. sept 2008;138(9):1796S- 1800S.
- [26] Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Gabrielli O. Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease*. 1 déc 2006;38:S291-4.

- [27] Professeur Christine SILVAIN ,Professeur Fabrice PIERRE,Docteur Valérie SOHE; Docteur Valérie SOHET;Intérêt d'un rétablissement systématique précoce de la flore intestinale chez les nouveau-nés nés par césarienne. Un enjeu thérapeutique. 2019 Université de Poitiers Faculté de Médecine et Pharmacie THESE Poitiers 12.
- [28] Doré J, Corthier G. Le microbiote intestinal humain. Gastroentérologie Clinique et Biologique. 1 sept 2010;34(4, Supplement 1):7-16.
- [29] Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård I-L, Åberg N, Wold AE, et al. Escherichia coli in Infants' Intestinal Microflora: Colonization Rate, Strain Turnover, and Virulence Gene Carriage. PediatricResearch. juill 2003;54(1):8-14.
- [30] Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. Journal of PediatricGastroenterology and Nutrition. juill 2010;51(1):77-84.
- [31] Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factorsinfluencing the composition of the intestinal microbiota in earlyinfancy. Pediatrics. août 2006;118(2):511-21.
- [32] Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of ourmicrobiota: whois out there and what do they do? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology [Internet]. 2012;2. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00104/abstract>
- [33] BOUYGUES.A..LE PHYNOTYPE MYSENCHYMATEUX ET LA REPONSE AUX AGENTS ANTI-VEGF DANS LE CANCER COLORECTAL.2017.8.
- [34] Professeur Christine SILVAIN ,Professeur Fabrice PIERRE,Docteur Valérie SOHE; Docteur Valérie SOHET;Intérêt d'un rétablissement systématique précoce de la flore intestinale chez les nouveau-nés nés par césarienne. Un enjeu thérapeutique. 2019 Université de Poitiers Faculté de Médecine et Pharmacie THESE Poitiers 16
- [35] Francavilla R, Cristofori F, Tripaldi ME, Indrio F. Intervention for Dysbiosis in Children Born by C-Section. ANM. 2018;73(3):33-13.
- [36] <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Les-points-cles>

[37] <https://www.quebec.ca/sante/problemes-de-sante/cancer/cancer-colorectal-colon-et-rectum>

## **Annexe**

**Annexe I**  
**Composition et intérêt des milieux de culture utilisés.**

<b>Milieu de culture</b>	<b>Composition</b>	<b>Intérêt</b>
<b>Gélose nutritive</b>	Peptone de gélatine : 5.0 g/l Extrait de bœuf : 3.0 g/l Agar bactériologique : 15.0 g/l pH neutre de 6.8 ± 0.2.	Milieu non sélectif permettant la culture de plusieurs germes n'ayant pas d'exigences particulières.
<b>Gélose Columbia au sang cuit (chocolat)</b>	Incorporation de sang de mouton (10%) dans un milieu de base le Columbia à température élevée (80°C)	Milieu non sélectif enrichi favorisant la croissance des germes exigeants et anaérobies.
<b>Gélose Columbia au sang frais</b>	Incorporation de sang de mouton (10%) dans un milieu de base le Columbia à basse température (47°C).	Milieu non sélectif enrichi favorisant la croissance des germes exigeants et anaérobies.
<b>Gélose EMB</b>	Peptone bactériologique : 10.0 g/l Lactose : 5.0 g/l Saccharose : 5.0 g/l Phosphate di potassique : 2.0 g/l Éosine : 10.4 g/l Bleu de méthylène : 0.065 g/l Agar bactériologique : 13.5 g/l pH 7.2 ± 0,2	Milieu sélectif permettant d'isoler les Entérobactéries.
<b>Gélose Mac conkey</b>	Digestion pancréatique de la Gélatine : 17.0 g/l Lactose monohydrate : 10.0 g/l Chlorure de sodium : 5.0 g/l Peptones : 3.0g/l Sels biliaires : 1.5 g/l Rouge neutre : 0.030 g/l Cristal violet : 0.001 g/l Agar bactériologique : 13.5 g/l pH 7.1± 0,2	Milieu sélectif permettant l'isolement des Entérobactéries.
<b>Gélose Chapman</b>	D-mannitol 10g/l Chlorure de sodium 75g/l Digestion peptique de tissu animal 5g/l Digestion pancréatique de caséine 5g/l Extrait de bœuf 1g/l Rouge de phénol 0.025g/l Agar 15g/l Ph 7.4 ± 0.2	Milieu sélectif permettant la croissance des germes halophiles et de rares bactéries Gram négatives.

<b>Gélose PCA</b>	Tryptone 5g Extrait de levure 2.5g Glucose 1g Agar agar bacteriologique Ph:7.0± 0.2	Milieu non sélectif et relativement riche en nutriments, recommandé pour le dénombrement standardisé des bactéries aérobies
<b>Gélose BEA</b>	Extrait de bœuf 11g Digestion enzymatique de Gélatine 34,5 g/L Esculine 1g Sulfate de manganèse 0.05g Bile de bœuf 2g Citrate d'ammonium ferrique 0,5 g/L Gélose 15,0 g/L 15,0 g/L	milieu sélectif et différentiel, ce milieu teste la capacité des organismes à hydrolyser l'esculine en présence de bile. Il est couramment utilisé pour identifier les membres du genre streptocoques du groupe D et des entérocoques.

## Annexe II

### Tests primaires d'identification des souches bactériennes intestinales.

Test	protocole	Lecture
<b>Coloration de Gram</b>	Prélèvement d'une parcelle de culture en grattant la surface des colonies et incorporer progressivement dans une goutte d'eau physiologique stérile, faire sécher la lame dans la flamme du bec bunsen ensuite la recouvrir des colorants : violet de gentiane (1 min), lugol (1 min), alcool (10 secs), et la fushine (1 min), avec un lavage à l'eau distillée entre chaque étape de coloration. Puis observation sous microscope optique au grossissement	∞ Coloration des bactéries gram positif en violet, et gram négatif en rose.

	10x100 a l'aide de l'huile a immersion	
<b>Test de catalase</b>	Consiste à déposer une colonie à l'aide d'une pipette pasteur sur une gouttelette d'eau oxygénée ( <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ). La catalase est une enzyme oxydoréductase qui dégrade l' <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> en eau et dioxygène. $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	<p>⊖ Présence d'effervescence : la bactérie produit de la catalase.</p> <p>⊕ Absence d'effervescence : la bactérie ne produit pas de la catalase.</p>

### Annexe III

- 1- ONPG : test de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase par hydrolyse du substrat o-nitrophényl-bD-galactopyranoside.
- 2- ADH: décarboxylation de l'acide aminé arginine par l'arginine dihydrolase.
- 3- LDC: décarboxylations de l'acide aminé lysine par la lysine décarboxylase.
- 4- ODC: décarboxylations de l'acide aminé ornithine par l'ornithine décarboxylase.
- 5- CIT: utilisation du citrate comme seule source de carbone.
- 6- H<sub>2</sub>S: production de sulfure d'hydrogène.
- 7- URE: test de l'enzyme uréase.
- 8- TDA (Tryptophane désaminase): détection de l'enzyme tryptophane désaminase: réactif à mettre - Chlorure ferrique.
- 9- IND: Test Indole - production d'indole à partir de tryptophane par l'enzyme tryptophanase. Réactif - L'indole est détecté par l'ajout du réactif de Kovac.
- 10- VP : le test de Voges-Proskauer pour la détection de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol) produite par fermentation du glucose par des bactéries utilisant la voie du butylène glycol.
- 11- GEL: test de production de l'enzyme gélatinase qui liquéfie la gélatine.
- 12- GLU: fermentation du glucose (sucre hexose).
- 13- MAN: fermentation du mannose (sucre hexose).
- 14- INO: fermentation de l'inositol (polyalcool cyclique).
- 15- SOR: fermentation du sorbitol (sucre d'alcool).
- 16- RHA: fermentation du rhamnose (sucre de méthyl pentose).
- 17- SAC: fermentation du saccharose (disaccharide).
- 18- MEL: fermentation du mélibiose (disaccharide).
- 19- AMY: fermentation de l'amygdaline (glycoside).

20- ARA: fermentation de l'arabinose (sucre pentose).

## **Résumé**

Le cancer colorectal est le 3ème cancer dans le monde. Ce type de cancer constitue de plus en plus un problème majeur de santé publique. L'équilibre du microbiote intestinal est un gage de bonne santé et l'intérêt de son rétablissement en cas de dysbiose est largement démontré. Certaines souches bactériennes peuvent favoriser ou lutter contre le cancer colorectal. Dans notre étude on procède à l'identification de souches bactériennes du microbiote intestinal des patients cancéreux qui peuvent avoir une relation avec le développement du cancer colorectal.

Cette présente étude a été menée sur des patients de l'EPH d'AMIZOUR qui démontre une diversité de souches bactériennes chez les deux patientes. CES résultats nous permettent de conclure que chaque patient (échantillon) possède un microbiote qui lui est propre, c'est-à-dire qu'il diffère suffisamment de celui d'autre échantillon pour être reconnu.

**Mots clés:** Microbiote, charge bactérienne, cancer colorectal ; identification.

## **Abstract**

Colorectal cancer is the 3rd cancer in the world. This type of cancer is increasingly a major public health problem. The balance of the intestinal microbiota is a guarantee of good health and the interest of its recovery in the event of dysbiosis has been widely demonstrated. Certain bacterial strains can promote or fight against colorectal cancer. In our study, we identify bacterial strains from the intestinal microbiota of cancer patients that may have a relationship with the development of colorectal cancer. This present study was conducted on patients of the EPH of AMIZOUR which demonstrates a diversity of bacterial strains in the two patients. THESE results allow us to conclude that each patient (sample) has its own microbiota, i.e. it differs sufficiently from that of another sample to be recognized.

**Key words:** Microbiota; bacteria load; colorectal cancer; identification.



