

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Identification de souches bactériennes du
microbiome intestinale des patients
cancéreux (cas de cancer colorectal)**

Présenté par :

LEHRI Mokrane & SMAILI Yanis

Soutenu le :.....

Devant le jury composé de :

M. AMIR N	MCA	Président
M. ADJEBLI A	MCA	Encadreur
Mme. SALMI A	MCB	Examineur

Année universitaire : 2021 / 2022

Remerciement

*Nous tenons à exprimer notre profonde et immense gratitude ainsi que nos vifs remerciements à **Mr « ADJEBLI. A »** de nous avoir encadrés et épauler dans notre mémoire de fin d'étude. Votre bienveillance vos conseils et instruction et surtout pour nos donner du temps, malgré votre occupations intense.*

*On 'aimerait aussi souligner notre profonde reconnaissance à **Mr « MESSIS, A »** de nous avoir fait connaître la pratique biologique a proprement dite, et à notre co-promotrice « **M^{elle} TALBI. M** », pour votre aide si précieuse.*

*On remercie aussi **M. DJOUDI. F** et **Mme BENACHOUR** pour leur aide importante*

*On tenait également à remercier ; **MADAOUI Menad, MEHELLEB Dalila** et **LAHDIRI Nassim**, de l'aide, du soutien, de la patience et de la confiance que vous avez nous apporter. Merci d'être avec nous depuis notre premier jour au sein du laboratoire GBC.*

On remercie aussi toute l'équipe des stagiaires fin de cycle du laboratoire GBC pour tous les moments que nous avons vécus ensemble

On remercie également les membres de jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

*Nous tenons à remercier également l'ensemble de l'équipe de service d'oncologie d'hôpital d'Amizour plus précisent **Dr LOUARDIANE, Dr BRAHIMI, Dr LAMRI** et **M^{er} MAKHLOUF** qui nous ont ouvert leurs bras, acculer chaleureusement, suivre et aider avec joie, et bonne humour, et qui nous ont fournis tous le nécessaire pour travailler dans les bonnes conditions, pour faciliter notre travail durant la période de notre stage.*

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents pour leurs sacrifices et soutiens
tout au long de ma vie et aux quels je ne rendrai jamais assez
« Que Dieu les protège ».

A tous mes proches décédés et qui ne sont plus avec nous pour partager cette joie

A mes chères frères et sœurs : Meriem, Akila, Biba, Hinane, said,
Momoh et yanis pour leur patience et d'être à mes cotés

A mon binôme Yanis avec qui j'ai partagé les moments de stresse, de bossage,
inquiétudes, et de fatigue, mais aussi de découvertes, joie, de partage et des
moments de rire hystériques. C'est un exemple de travail d'équipe et de
compréhensions.

AUX merveilleuses et jolies rencontres faites au laboratoire GBC avec qui j'ai
partagé des informations, joie, de stress, et des rires. Sans oublier Mazigh pour sa
délicieuse purée à chaque déjeuner

Au finale je dédie ce travail à mes amis : Massi, Nourdin, Bachir, Razik, Aziz, et
toute la promotion MA 2021/2022.

Mokrane

Dédicaces

Je dédie ce travail :

En premier lieux à mes parent car sans eux je ne serais rien qui ont été a présents soutenu jusqu'à la fin je le dédie aussi à ma sœur que j'aime énormément malgré la distance qui nous sépare elle trouve toujours le moyen d'être à mes coté.

Aussi a mes amis qui mon aider à me décontracter et à me défouler, et aussi au belles rencontre que j'ai faites (Menad, Nassim, Dalila) des vraies bibliothèques mobile je vous remercieraient pas suffisaient car vous avez fait beaucoup pour nous.

A ma bien aimé, merci pour tes doux mots qui m'ont encouragé d'aller en avant

Mazigh merci pour les bon petite plats que tu nous prépare et merci à Bachir pour ces belles prise de photos que tu nous faits merci énormément a vous deux car on a rencontré des frères des amis toujours souriant et plan dénigrer une formidable rencontre merci à vous

PS : Je le dédie aussi à ma personne et mon achrik « baba » on s'est démener pour le finir mon ami

sinay

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

Sommaire

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

Partie bibliographique

I. Le Microbiome intestinal.....	3
I. 1. Définition	3
I. 2. Généralités.....	3
I. 3. Composition du microbiome intestinal.....	4
I. 4. Chronologie d’installation et du développement de microbiote intestinal.....	5
I. 5. Fonctions du microbiote intestinal.....	7
I. 5.1 Effet barrière et fonctions immunitaires.....	7
I. 5. 2. Fonctions métaboliques.....	8
I. 6. Techniques d’exploitation du microbiome intestinal.....	11
II. Cancers liés au tube digestif	12
II. 1. Définition et généralités.....	12
II. 2. Cancer de l’œsophage.....	12
II. 3. Cancer de l’estomac.....	13
II. 4. Cancer colorectal.....	14
II. 4. 1. Épidémiologie.....	14
II. 4. 2. Facteurs de risque et facteurs de protection.....	15
II. 4. 3. Traitements.....	17
II. 5. Impact de microbiome intestinal sur le développement du Cancer colorectal.....	20

Matériels et méthodes

I. Objectif de l’étude.....	23
I.1. Population cible.....	23
I.2. Récolte des informations sur les patients.....	23
I.3. Echantillonnage.....	23
I.4. Transport et stockage.....	24
II. Analyse microbiologique.....	24
II.1. Milieux de cultures utilisées.....	24
II.2. Dénombrement de la flore totale (isolement et criblage).....	25

II.3. Réalisation des repiquages.....	25
II.4. Recherche des germes pathogènes.....	26
II.4.1. Coloration de gram.....	26
II.4.2. Teste de catalase.....	26
II.4.3. Test de l'oxydase.....	26
II.4.4. Galerie biochimique.....	27
III. Analyse moléculaire.....	28
III.1. Extraction de l'ARN.....	28
III.1.1. Protocole d'extraction 1 : Trizol-Lysozyme.....	28
III.1.2. Protocole d'extraction 2 : QiAmp RNA Viral Kit.....	31
III.1.3. Protocole d'extraction 3 : QiAmp RNA Viral / Lysozyme.....	33

Résultats et discussion

I. Caractérisation de la population d'étude.....	35
I.1. Répartition des patients selon l'âge.....	35
I.2. Répartition des patients selon le sexe.....	35
I.3. Répartition des patients selon les donneurs d'échantillon.....	36
I.4. Répartition des patients selon le type de cancer.....	36
I.5. Répartition des patients selon les facteurs de risques.....	37
II. Analyses microbiologiques.....	38
II.1. Dénombrement de la flore totale.....	38
II.2. Identification bactérienne.....	40
III. Analyse moléculaire.....	41
Conclusion et perspectives.....	44
Références bibliographiques	

Annexes

Liste des abréviations

CCR : Cancer colorectal

ARNr : Acid Ribonucleique ribosomal

IgA : Immunoglobulines A

AGCC : Acide gras à chaîne courte

RGO : Reflux gastro-œsophagien

IDH : Indice de développement humain

MII : Maladie inflammatoire de l'intestin

IMC : Indice de masse corporelle

PAF : Polypose adénomateuse familiale

APC : Polype adénomateux du colon

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

ETBF : Entérotoxine *Bacteroides fragilis*

EPH : Etablissement Public Hospitalier

EMB : Eosine-Bleu de Méthylène.

Mc C : gélose Mac Conkey

GN : gélose nutritive.

GSC : gélose Columbia au sang cuit.

GSF : gélose Columbia au sang frais.

BEA : Bile Esculine Azide.

H₂S : thiosulfate de sodium.

API : Appareils et Procédés d'Identification.

URE : uréase.

IND : Indole.

LAC : Lactose.

RM : Rouge de Méthyle.

VP : Voges- Proskauer

KIA : Klinger's Iron Agar

NR : Nitrate réductase.

CAT : Catalase

OXY : Oxydase

GLU : Glucose

CIT : Citrate

UFC : Unité formant une colonie.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

PSM : Poste de sécurité microbiologique

SDS : Sodium ou dodécylsulfate de Sodium

ATCD : Antécédent médical

HTA : hypertension artérielle

TAD : Tryptophanase désaminase

Q-RT-PCR : Real Time Quantitative Réaction en chaîne par polymérase

Rpm : rotation par minute

Lite des tableaux

Tableau I. Résultats de dénombrement de la flore totale (échantillon 1).....	39
Tableau II. Résultats de dénombrement de la flore totale (échantillon 2).....	39
Tableau III. Résultats d'identification bactériens par la galerie biochimique (classique).....	40
Tableau IV. Résultats d'absorbance d'ARN bactérienne par le spectrophotomètre.....	42

Liste des figures

Figure 01 : Emplacement du microbiome intestinal.....	3
Figure 02 : Représentation du microbiome au niveau du gastro-intestinal.....	4
Figure 03 : Apparition et formation de microbiome humain au cours de la vie, et ces perturbations.....	6
Figure 04 : Les interactions nutritionnelles (cross-feeding) dans la dégradation et la fermentation des polysaccharides par le microbiome intestinal humain.....	10
Figure 05 : Métabolisme des protéines par le microbiome intestinal humain.....	11
Figure 06 : Schéma montrant le lien entre l'infection par la bactérie <i>H. pylori</i> et le cancer de l'estomac.....	13
Figure 07 : Un modèle bactérien driver–passenger pour le cancer colorectal.....	20
Figure 08 : Photographies: étapes de préparation de la solution mère.....	25
Figure 09 : Lysozyme Lyophilisée.....	29
Figure 10 : Etapes de préparation de suspension de la matière fécale.....	29
Figure 11 : Surnageant (1) et après l'ajout de Trizol (2).....	30
Figure 12 : Résultats de centrifugation.....	30
Figure 13 : Tampon de lavage Buffer AV1 et Buffer AV2 utilisées.....	31
Figure 14 : Kit d'extraction QiAmp RNA Viral.....	31
Figure 15 : Thermo Mixer C	32
Figure 16 : Colonne d'extraction des acides nucléiques.....	32
Figure 17 : Répartition graphique des patients selon l'âge.....	36
Figure 18 : Représentation des cancers colorectaux selon le sexe.....	36
Figure 19 : Répartition des patients selon les donneurs d'échantillon.....	36
Figure 20 : Représentation graphique des patients selon le type de cancer.....	37
Figure 21 : Représentation graphique des facteurs de risque.....	37
Figure 22 : Photographie montrant une hémolyse de type alpha sur gélose au sang frais.....	41
Figure 23 : Spectrophotomètre à microvolumes BioDrop Duo+.....	41
Figure 24 : Résultats d'absorbance de protocole Trizol-Lysozyme.....	42
Figure 25 : Résultats d'absorbance de protocole kit QiAmp RNA.....	42

Introduction

Le microbiome intestinal représente l'ensemble des micro-organismes qui colonisent le tube digestif humain, principalement dans l'intestin grêle et le côlon (anaérobies) **(Bruneau et al., 2018)**. L'acidité de l'estomac ralentit la colonisation par les microorganismes. Il existe environ 10^{14} espèces de micro-organismes dans le tube digestif humain : bactéries, virus, levures et archées. L'étude du microbiome intestinal a révélé le rôle fondamental qu'il joue dans la physiologie intestinale, et plus généralement dans la santé humaine, en tant que véritable « organe caché ». Chaque personne a des centaines de bactéries différentes dans son microbiome. Ainsi, le microbiome (ensemble des gènes du microbiote) représente une très grande diversité, d'environ 100 à 150 fois supérieure au génome humain. Vivant dans un environnement très particulier, ces bactéries sont difficiles à cultiver au laboratoire **(Bruneau et al., 2018)**.

Le microbiome intestinal remplit de nombreuses fonctions physiologiques qui ont des effets importants sur l'hôte. Parmi eux, la fermentation des substrats joue un rôle important dans le maintien de la santé de l'hôte **(Bernalier-Donadille, 2010)**. La capacité métabolique du microbiote intestinal humain est liée avec les propriétés des substrats disponibles pour la fermentation colique. Ces substrats sont de source exogène (alimentaire) ou endogène (produit par l'hôte). Par conséquent, le microbiote intestinal peut utiliser une variété de substrats pour la fermentation, ce qui contribue à maintenir la biodiversité bactérienne de cet écosystème **(Bernalier-Donadille, 2010)**.

Grâce aux travaux de R. Koch, certaines souches de bactéries se sont avérées intrinsèquement pathogène. Par exemple, la bactérie *Helicobacter pylori* a été classée il y a plus de 20 ans comme cancérigène de classe I par le Centre international de recherche sur le cancer, et est impliquée dans les trois quarts de l'estomac dans le monde. Néanmoins, l'idée qu'un micro-organisme correspondrait à une maladie cancéreuse est rarement vérifiée, mais il semblerait que des modifications plus globales du microbiome participent aux mécanismes liés à la carcinogénèse. Ainsi il peut être impliqué dans la carcinogénèse de plusieurs manières : du métabolisme de l'hôte ainsi que des voies de prolifération et de mort cellulaire, altération des mécanismes inflammatoires, les mécanismes pathogéniques directes et immunosuppression **(Anthony, 2018)**. Il a été démontré que le microbiome des patients atteints de cancers coliques sont enrichi de gènes de virulences liés à la présence de *Fusobacteria* et de *Providencia*. Ce qui nous renseigne sur le rôle de microbiome intestinal dans le développement de cancer colique tel que le cancer colorectal (CCR).

Par le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'identification de certaines souches bactériennes du microbiome intestinal des patients cancéreux (cancer colorectal) admis au niveau de service d'oncologie d'EPH d'Amizour (Wilaya de Bejaia), afin d'avoir une idée sur les perturbations qui peut toucher le microbiote intestinal de ces patients, et faire un lien approximatif entre le microbiote intestinal et le cancer colorectal.

I. Le microbiome intestinal

I. 1. Définition

Le terme « microbiote intestinal » correspond à des micro-organismes qui vivent dans le tractus digestif sans provoquer de perturbation. Cette association profite aux deux parties : l'hébergeur (hôte) offre un environnement riche en nutriments (métabolites) permet le développement du microbiote, tandis que les bactéries symbiotiques remplissent des fonctions essentielles que l'homme ne peut pas remplir par lui-même, comme la digestion de polysaccharides complexes et mise en place d'un système immunitaire efficace, et la production de certaines vitamines...etc (INSERM, 2021).

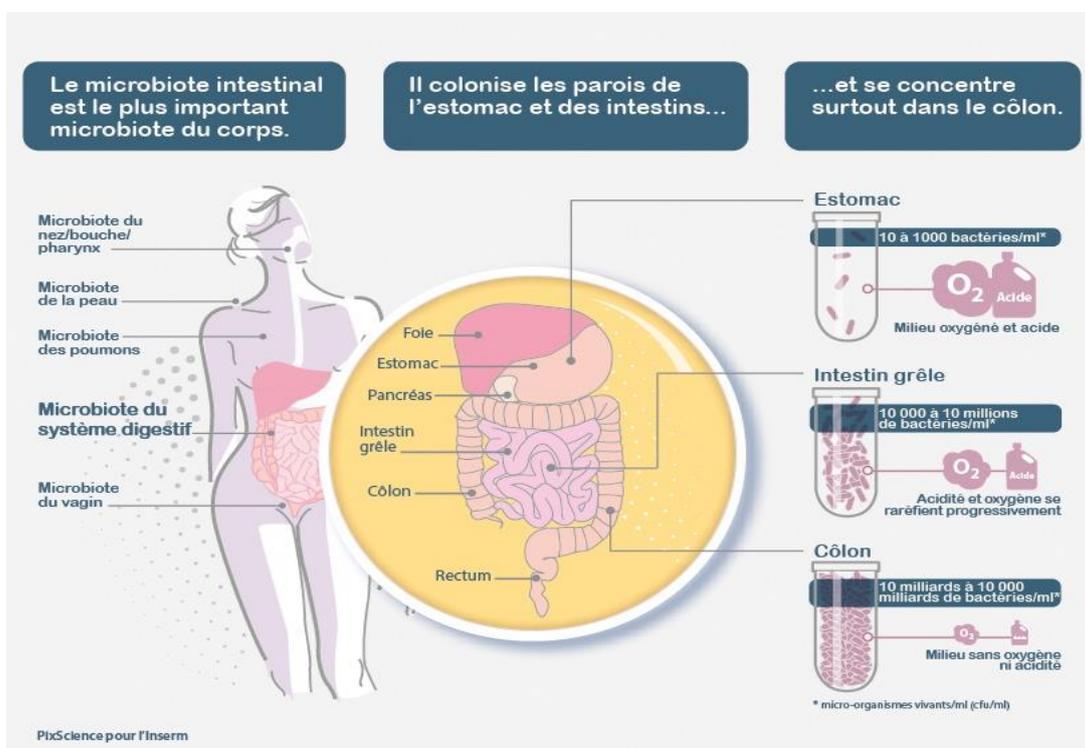


Figure 01 : emplacement du microbiote intestinal (INSERM, 2021)

I. 2. Généralités

Il existe une petite partie de l'espèce bactérienne qui compose un microbiome intestinal spécifique à son hôte, tandis qu'une autre partie est commune avec chaque individu, formant un noyau métagénomique (Nau, 2011). Avec plusieurs mécanismes finement régulés, ces micro-organismes sont capables de coloniser les surfaces et de vivre en symbiose avec l'hôte. Par conséquent, le microbiote intestinal lui-même peut être considéré comme un organe caché (organe à part entière) qui a co-évolué avec l'hôte pour établir une relation symbiotique qui assure l'homéostasie physiologique (Bäckhed et al., 2005).

Outre, un microbiome équilibré dans sa composition en espèces bactériennes chez les sujets sains est dit "en état de biose" ou eubiose. Alors que la « dysbiose » désigne le déséquilibre du microbiome, avec des conséquences néfastes pour l'individu. Ce déséquilibre se traduit souvent par un excès de micro-organismes nuisibles ou un manque de micro-organismes bénéfiques pour l'hôte. Cela permet d'étudier et d'établir des liens entre cette situation de dysbiose et diverses pathologies, dans le but de développer des stratégies de restauration des équilibres écologiques (Nau, 2011).

I.3. Composition du microbiote intestinal

Il existe environ 10^{14} espèces de micro-organismes dans le tube digestif humain : bactéries, virus, levures et archées. Ces micro-organismes sont distribués le long d'un gradient de concentration dans le tube digestif, avec la plus grande densité dans le côlon. Le côlon distal est 100 fois plus dense que le côlon proximal en raison de l'augmentation des espèces anaérobies stricts (Bruneau et al., 2018).

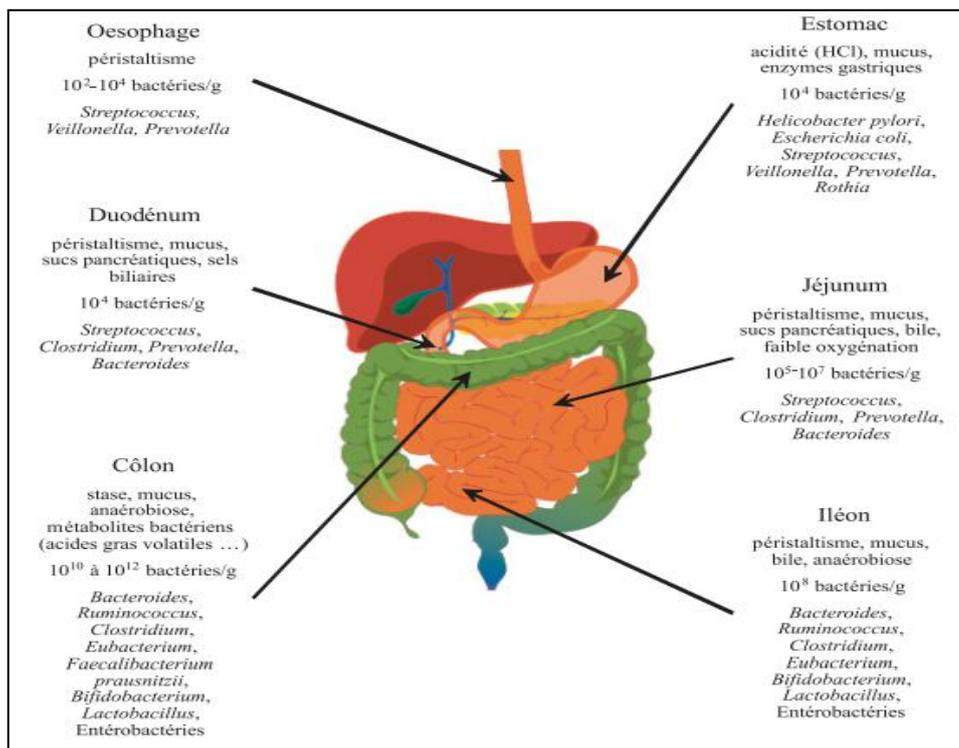


Figure 02 : Répartition du microbiote au niveau du tractus gastro-intestinal (Coudeyras & Forestier., 2010).

Les progrès en biologie moléculaire, et particulièrement le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S de la petite sous-unité du ribosome bactérien a permis d'identifier la composition du microbiome intestinal. Les espèces bactériennes intestinales sont divisées en 4

phyla essentiel : *firmicutes*, *bacteroidetes*, *actinobacteria*, et *proteobacteria*. Les *firmicutes* et les *bacteroidetes* ce sont les deux phyla qui dominants le microbiome avec une représentativité respective de 60–75 % et 30–40 % (Landman et Quévrain., 2016). Comme pour tout écosystème bactérien, plus de 90 % des espèces du microbiome intestinal ne sont pas cultivables. Les bactéries anaérobies facultatives constituent le microbiome sous-dominant. Outre la flore dominante et sous-dominante, il existe également une flore transitoire très polymorphe constituée de bactéries lactiques et de levures (INSERM, 2021).

Le phylum le plus représentatif est celui des *Firmicutes* "bactéries Gram-positives". Il comprend les groupes suivants :

- « *Eubacterium rectale Clostridium coccoïdes* » : selon les recherches, il représente en moyenne 14 % à 31 % des bactéries totales. Ce groupe appartient aux genres *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, et *Butyrivibrio*.
- « *Clostridium leptum* » : contient 16 à 22 % espèces en moyenne. Représenter par les espèces *Ruminococcus albus*, *Faecali bacterium prausnitzii*, et *Ruminococcus flavefaciens*, est un groupe également très important en termes de dominance (Seksiket al., 2003).

Le phylum des *Bacteroidetes* est composé par les genres tel que : Les *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*. Ces genres sont toujours présents entre 9 à 42% des espèces bactériennes selon les études (Rigottier-Gois et al., 2003).

Le phylum *Actinobacteria* et le moins observé en terme de dominance. Il est représenté par les *Bifidobacterium* (0,7 à 10 %), quelques espèces du groupe *Collinsella-Atopobium* (0,3 à 3,7%). Le microbiote fécal contient plus rarement les *Entérobacteriaceae* (0,4 à 1%) ainsi que les *lactobacillus* et *streptococcus* (2%) (Rigottier-Gois et al., 2003).

I. 4. Chronologie d'installation et du développement de microbiome intestinal

À la naissance, le tractus gastro-intestinal du nouveau-né est stérile, mais dès l'accouchement il se retrouve colonisé par une population bactérienne qui atteignent rapidement 10¹¹ bactéries par gramme de selles, cet environnement est très permissif à la naissance, car les mécanismes immunitaires du nouveau-né n'y sont pas encore développés. Le premier contact entre les cellules épithéliales du tube digestif et l'afflux bactérien massif sera décisif, En quelques jours, des milliards de bactéries vont coloniser le tube digestif du bébé, mais pour que cette population bactérienne « explose », il faut que les premières colonies favorisent l'arrivée des suivantes, tel que l'installation des aéro-anaérobies facultatifs favorise le développement des

anaérobies stricts. Cette colonisation microbienne se fait de façon ordonnée et elle dépend de facteurs endogènes et exogènes (**theragora.fr, 2017**) :

- **Les facteurs exogènes** : Ils sont liés au contact avec la flore microbienne maternelle (fécale, vaginale et cutanée) la flore environnementale et le type d'alimentation et parfois l'antibiothérapie peut aussi avoir un effet perturbateur. Récemment, des études ont incriminé le lait maternel dans le transport au nouveau-né de bactéries provenant du microbiome maternel. En effet, le lait maternel n'est pas stérile même s'il est collecté de manière aseptique (**Perez et al., 2007**).
- **Les facteurs endogènes** : concerne les sécrétions du tractus digestif et les produits métaboliques des premiers microorganismes qui sont déjà installés.

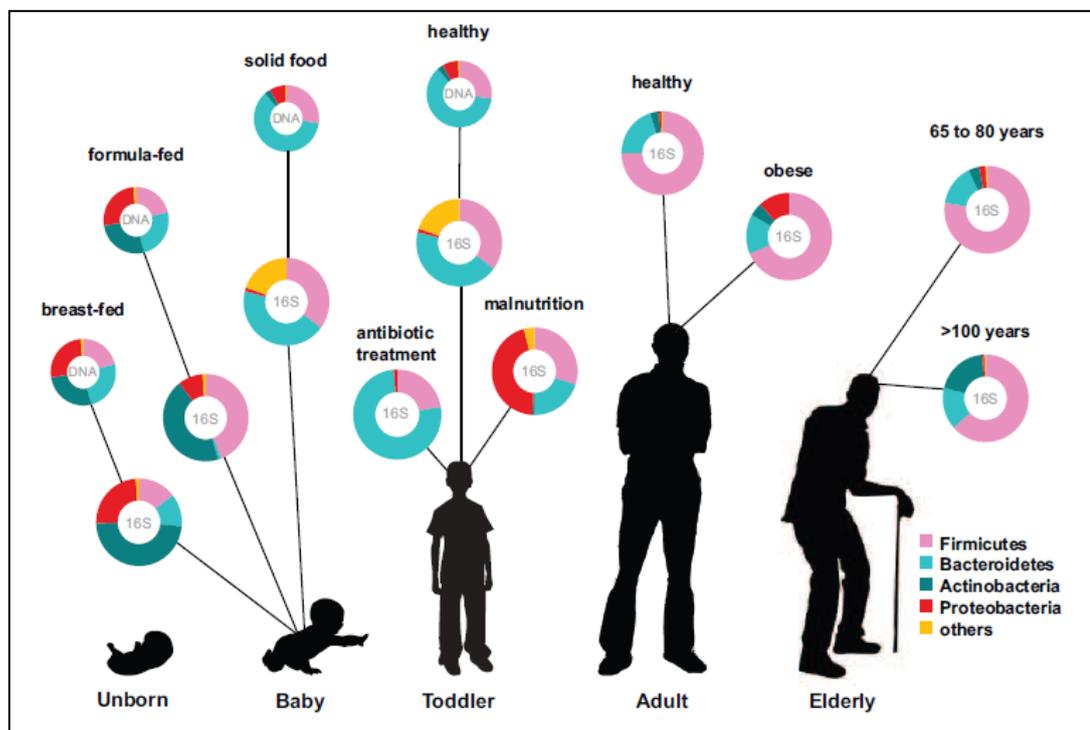


Figure 03 : apparition et formation de microbiote humain au cours de la vie, et ces perturbations (**Ottman et al., 2012**).

La diversité et la composition du microbiome intestinal sont influencées par de nombreux facteurs, notamment le type d'alimentation pendant la petite enfance, les médicaments, le mode d'accouchement, le microbiome maternel, l'âge gestationnel, le mode de vie. Cela explique la différence de microbiome intestinal de chaque individu. Toutefois, il existe certaines espèces bactériennes qui sont communes chez toutes personnes telles que plusieurs *Bifidobactéries*, les *Lactobacilles* et aussi des *Bacteroides uniformis*, *Roseburia intestinalis* avec l'âge la composition du microbiome intestinal se complexifie progressivement. Ce n'est qu'à l'âge de 2-3 ans que la

flore intestinale atteint sa maturité. Stable au cours du temps, la composition de microbiome intestinal peut évoluer d'une manière temporaire au cours de la vie en fonction de l'alimentation, l'environnement, stress ou bien l'état de santé, et Il peut néanmoins revenir à son état initial en 1 à 2 mois (**Ottman et al., 2012**).

A un âge avancé le microbiote intestinal connaît un grand changement : sa composition et sa concentration bactérienne chutent, plus précisément les *Bifidobactéries*. Ceci est dû à une moins bonne capacité d'adhésion de ces dernières ou bien par des modifications de la composition chimique et de la structure du mucus. Dès lors, la diversité en *Bifidobactéries* se limite uniquement en deux espèces : *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium adolescentis*. D'où l'intérêt d'une supplémentation (**Ottman et al., 2012**).

I. 5. Fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal exerce des effets physiologiques, pour la plupart bénéfiques pour l'hôte, parmi ces fonctions, le rôle de barrière contre les micro-organismes pathogènes la maturation et le développement du système immunitaire et fonctions métaboliques.

Tout déséquilibre entre ces constituants est capable de perturber le fonctionnement de l'écosystème et d'être à l'origine de pathologies digestives (fonctionnelles, inflammatoires, infectieuses...) (**Gérard & Bernalier-Donadille., 2007**).

I. 5.1 Effet barrière et fonctions immunitaires

La compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion épithéliaux existe entre les agents pathogènes et les bactéries commensales dans l'intestin. De plus, le microbiote produit des bactériocines et peut stimuler les cellules épithéliales pour produire des peptides antimicrobiens. Il induit également la production d'IgA sécrétoires et favorise le fonctionnement normal des jonctions serrées entre les cellules épithéliales (**Hooper, 2004**).

Il réduit l'invasion des bactéries pathogènes. En plus de ses propriétés barrières, le microbiote intestinal joue également un rôle important dans le développement et la maturation du système immunitaire. La découverte de cette fonction fondamentale est venue de l'observation des différences entre les souris axéniques avec d'autres naturellement colonisés par un microbiote (animaux conventionnels) (**Macpherson & Harris., 2004**).

Le système immunitaire intestinal des souris sans germes présente de nombreuses anomalies : hypoplasie de la plaque de Peyer, la perte des lymphocytes intraépithéliaux,

déficience de certaines populations de lymphocytes T, diminution de la concentration en IgA, de la concentration sérique d'immunoglobulines et de la production de cytokines. De plus, après avoir inoculé ces souris sans germes avec des microbiotes de souris conventionnelles pendant quelques semaines, toutes ces anomalies ont disparu. Outre ces observations sur le fonctionnement global du microbiome, certaines espèces bactériennes semblent avoir des propriétés spécifiques. Des études récentes ont montré que certaines bactéries stimulent spécifiquement les populations Th17 intestinales (**Gaboriau-Routhiau et al., 2009**). Tandis que d'autres stimulent les T régulateurs (Tregs) grâce aux acides gras à chaîne courte qu'elles produisent (**Smith et al., 2013**). Ils participent donc au maintien de l'homéostasie intestinale.

I. 5. 2. Fonctions métaboliques

Le microbiote exerce un rôle dans la digestion de nombreuses substances présentes dans le côlon en particulier le métabolisme des lipides, des sucres, des protéines et des gaz.

- **Métabolisme des lipides**

Les lipides de la lumière colique comprennent trois origines principales (**Masson, 2014**) :

- a) Les lipides non absorbés dans l'intestin grêle (5 à 8 grammes de lipides par jour chez un sujet sain).
- b) Ceux provenant de la desquamation des colonocytes.
- c) Les lipides bactériens.

Les acides gras non absorbés dans l'intestin grêle sont transformés par les bactéries du microbiote colique (par hydrolyse, oxydation, réduction et hydroxylation). La majeure partie du cholestérol colique provient de la bile (70 %), le reste provenant des aliments (20 %) et de la desquamation des cellules épithéliales intestinales (10 %) (**Lichtenstein, 1990**). Il est transformé par le microbiote en coprostanol qui n'est pas absorbé et est donc il sera éliminé dans les selles.

Les acides biliaires sont des produits de la conversion du cholestérol par le foie, qui se lient à la glycine ou à la taurine, ce qui entraîne une augmentation de l'amphiphilie. 95% des acides biliaires suivent le cycle entéro-hépatique : sécrétion biliaire, réabsorbée dans l'iléon terminal, renvoyée au foie par le système veineux porte, puis à nouveau sécrétée dans la bile. Seuls 5 % des acides biliaires sécrétés dans la bile arrivent donc au côlon où ils sont métabolisés par les bactéries du microbiote en acides biliaires secondaires (**Ridlon et al., 2006**).

La déconjugaison (favorisé par des espèces des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, etc.) favorise leur absorption passive ce qui les rend plus hydrophobes (**Ridlon et al., 2006**).

Les acides cholique et chénodésoxycholique, sont des acides biliaries primaires majoritaires chez l'homme, sont transformés par les espèces du genre *Clostridium* en acides biliaries secondaires (acides désoxycholique et lithocholique) qui pourraient avoir des effets carcinogènes sur la muqueuse colique (**Landman & Quévrain., 2016**).

- **Métabolisme des glucides**

La vaste diversité des hydrates de carbone disponibles (présents dans les fruits, légumes et céréales) permet au grand nombre d'espèces d'assurer la fermentation. La majorité de ces espèces bactériennes utilisent la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas), pour convertir les hydrates de carbone en pyruvate. Par conséquent, le pyruvate est le métabolite central de ces processus de fermentation, qui est ensuite converti en produits de fermentation par différentes voies. Les principaux métabolites formés sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Mais parfois, certaines bactéries glycolytiques produisent des métabolites intermédiaires : comme le succinate, le lactate, l'acrylate, l'éthanol, le formiate, et même H₂ et CO₂ (**Figure 04**), qui ne s'accumulent pas dans l'organisme sain car ils sont rapidement détruits par d'autres espèces bactériennes (**Bernalier-Donadille, 2010**).

La majorité des espèces qui dominent le côlon (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*...) produisent de l'acétate. Les principaux AGCC (acétate, propionate et butyrate) seront absorbés par les cellules épithéliales et métabolisés dans différents organes (foie, muscle, cerveau...). L'acide propionique est synthétisé principalement par l'espèce *Bacteroides*, ainsi que par *Propionibacterium* et *Veillonella* (**Bernalier-Donadille, 2010**).

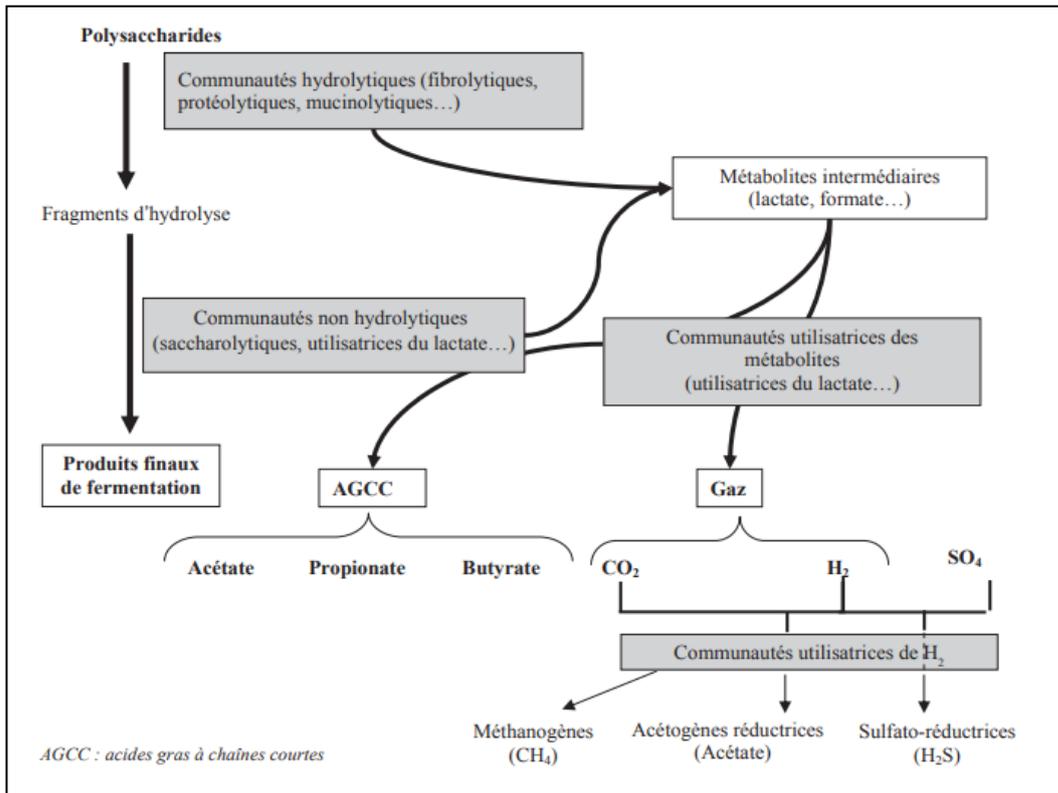


Figure 04 : Les Interactions nutritionnelles (cross-feeding) dans la dégradation et la fermentation des polysaccharides par le microbiote intestinal humain (**Bernalier-Donadille,**

- **Métabolisme des protéines**

Quantitativement, La biodégradation des protéines est moins importante que celui des polysaccharides, mais essentielle comme principale source d'azote des bactéries colique.

Plusieurs espèces bactériennes dites « protéolytiques » appartenant aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*, peuvent hydrolyser les protéines par les enzymes protéolytiques (protéases) aboutit à la libération de peptides (**Landman & Quévrain., 2016**).

Le phénol et l'indole produites par la décomposition des acides aminés aromatiques grâce à quelques espèces de *Clostridium*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont absorbés et détoxifiés par la muqueuse colique, et excrétés dans les urines (**Figure 05**). Cependant une augmentation de phénol et d'indole a été décrite en association à diverses situations pathologiques chez l'homme, notamment en cas de cancer colorectal (**Macfarlane & Gibson., 1994**).

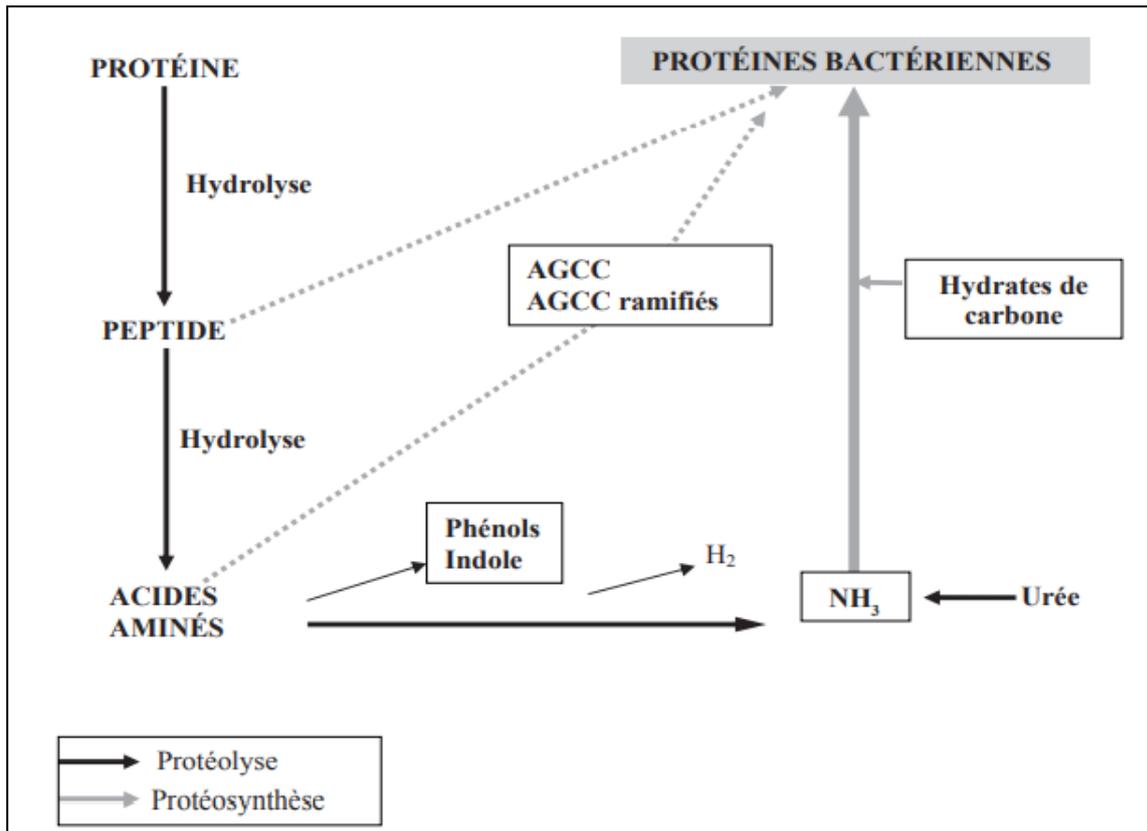


Figure 05 : Métabolisme des protéines par le microbiome intestinal humain (Bernalier-Donadille, 2010).

- **Formation de gaz**

La fermentation dans le côlon entraîne la production de grandes quantités d'hydrogène par jour. Son élimination peut être rectale ou respiratoire. Mais la majeure partie de l'hydrogène est convertie in situ par : formation de sulfures par les bactéries sulfato-réductrices (essentiellement les *Desulfovibrio*), Production de l'acétate à partir de CO₂ par les espèces acétogènes, et transformation en méthane grâce aux archées méthanogènes (Masson, 2014).

I. 5. Techniques d'exploration du microbiome intestinal :

Parce que la grande majorité des bactéries du tube digestif sont anaérobies, l'exploration du microbiote intestinal par les techniques classiques de culture microbienne est très difficile. En utilisant des techniques moléculaires qui se basent sur l'ARN ribosomal 16s de petite sous unité comme marqueur phylogénétique, de grands progrès ont été réalisés dans l'étude du microbiote intestinal. La métagénomique a franchi une nouvelle étape dans la découverte du microbiote. Elle permet d'identifier les espèces bactériennes qui composent le microbiote intestinal par la mise en évidence de leurs séquences génomiques. Cette technique permet d'anticiper certaines pathologies grâce au microbiote (INSERM, 2021).

II. Cancers liés au tube digestif

II. 1. Définition et généralités

Le cancer est une tumeur provoquée par la transformation et la multiplication des cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive, les cellules forment une masse appelé tumeur maligne, elles peuvent aussi se détacher de la tumeur et à envahir les tissus voisins grâce aux vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques qu'elles utilisent pour migrer provoquant ainsi des métastases (**Morel, 2008**).

Le cancer gastro-intestinal englobe tous les cancers de l'appareil digestif, qui désignent l'ensemble des tumeurs malignes qui se développent avec comme point de départ le tube digestif inclus l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon, le rectum et jusqu'à l'anus ou les glandes qui lui sont annexées. Pour la majorité d'entre elles, ces tumeurs sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'elles ont pour origine les muqueuses qui tapissent les parois du tube digestif ou des canaux excrétoires des glandes. Le nombre de nouveaux cas identifiés chaque année est en augmentation (**Morel, 2008**).

Les cancers digestifs les plus fréquents sont le cancer du côlon et du rectum. Le diagnostic requiert généralement une endoscopie (méthode de visualisation de l'intérieur des organes), avec confirmation par une biopsie des tissus suspects (**Nantes, 2016**).

II. 2. Cancer de l'œsophage

Le cancer de l'œsophage est une tumeur maligne hautement mortelle dont l'incidence augmente rapidement à l'échelle mondiale. Il a été classé quatrième cause de décès lié au cancer, ce qui entraîne un fardeau substantiel pour la santé publique (**Feng et al., 2019**). Dans les trois quarts des cas, le cancer de l'œsophage survient chez les hommes, le plus souvent après l'âge de 50 ans. La plupart des patients avaient une maladie reconnue, ce qui explique le taux de mortalité élevé dans la plupart des pays (**Gupta, & Kumar., 2017**). Les facteurs de risque connus comprennent le reflux gastro-œsophagien (RGO), l'obésité, le tabagisme, une faible consommation de fruits et consommation de légumes et d'alcool.

Le microbiote œsophagien pourrait améliorer le diagnostic et le traitement du cancer. Selon une étude italienne, les chercheurs ont pu mettre en évidence un réseau microbien unique qui existe dans l'œsophage chez les patients atteints d'un cancer de l'œsophage ou de l'œsophage de Barrett (**Lopetuso et al., 2019**). Une étude récente sur des patients atteints de cancer de l'œsophage a montré une diminution significative de *Firmicutes* ainsi qu'une augmentation

robuste statistiquement significative de *Fusobacteria* et de *Bacteroidetes* avec son genre correspondant *Bacteroides* par rapport au groupe témoin (Jiang et al., 2021). Cette découverte pourrait être utilisée pour identifier les personnes à risque et ouvrir la voie à de nouveaux traitements.

II. 3. Cancer de l'estomac

Le cancer gastrique est un cancer qui se forme dans les tissus qui tapissent l'estomac. La plupart des cancers de l'estomac débutent dans les cellules de la couche interne de l'estomac (la muqueuse) qui produisent et libèrent normalement du mucus et d'autres fluides. Ces cancers sont appelés adénocarcinomes et représentent environ 90 % des cancers de l'estomac (ESMO., 2012).

La plupart des cancers de l'estomac semblent dus à la multiplication et à l'installation d'une bactérie (*Helicobacter pylori*) dans l'estomac qui produit une protéine oncogène (Figure 06). Le lien entre *H. pylori* et le cancer gastrique a fait l'objet de débats pendant un certain nombre d'années (Wroblewski et al., 2010). Cependant, plusieurs études, y compris une étude portant sur 1 526 patients japonais, ont maintenant fourni des preuves claires que l'infection à *H. pylori* augmente considérablement le risque de cancer gastrique (Uemura et al., 2001).

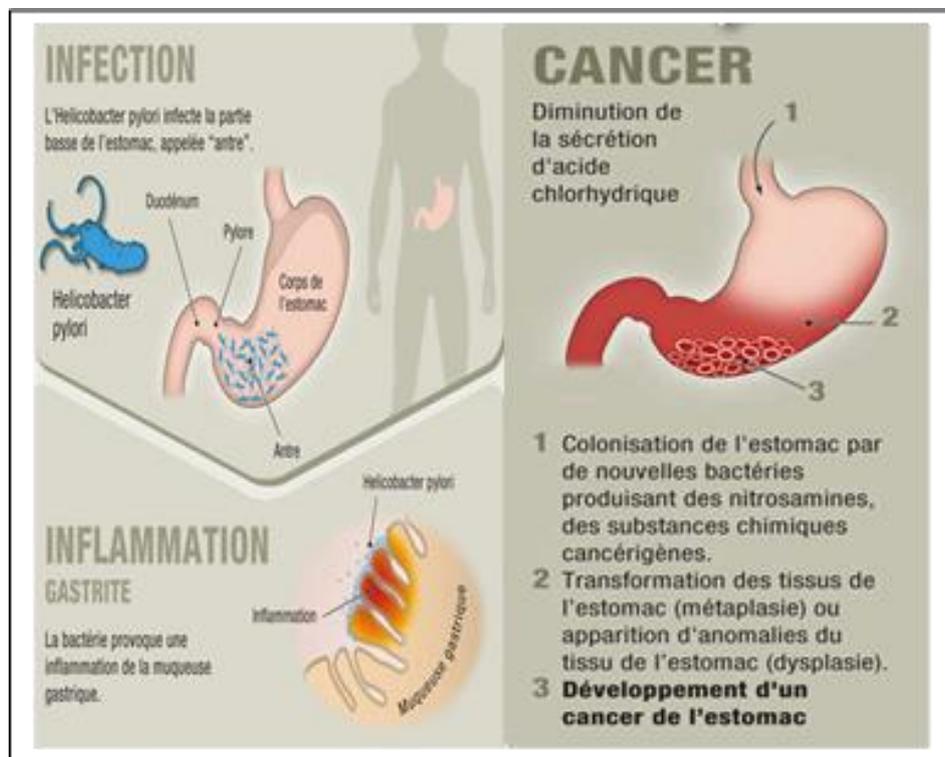


Figure 06 : Schéma montrant le lien entre l'infection par la bactérie *H. pylori* et le cancer de l'estomac (www.planetesante.ch)

II.4. Cancer colorectal

Le CCR est l'un des cancers les plus fréquents sur le plan mondial, son incidence ne cesse d'augmenter ces dernières années et sa mortalité est d'environ 50%, ce qui fait de lui un important problème de santé publique. Le CCR est l'étape ultime de la transformation d'un adénome qui est une tumeur bénigne en tumeur maligne, il se développe le plus souvent au niveau du côlon sigmoïde ou du rectum (le passage qui relie le côlon à l'anus). Parfois, des excroissances anormales, appelées polypes, se forment dans le côlon ou le rectum. Au fil du temps, certains de ces polypes peuvent se transformer en cancer. Les tests de dépistage aide à trouver ces polypes afin qu'ils puissent être enlevés avant de se transformer en cancer. Le dépistage aide également à détecter le cancer colorectal à un stade précoce, lorsque le traitement fonctionne le mieux (**cdc.gov. 2022**).

II. 4. 1 Épidémiologie

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus populaire chez les hommes et le deuxième cancer le plus fréquent chez les femmes. Il y a eu plus de 1,9 million de nouveaux cas en 2020. Le cancer colorectal est la deuxième cause la plus fréquente de décès par cancer, dont on estime qu'elle est responsable de près de 935 000 décès par cancer (**Arnold et al., 2017**). À l'échelle mondiale, c'est l'un des cancers dont l'incidence augmente, représentant 11% de tous les diagnostics de cancer (**Wong et al., 2020**). Selon les données de GLOBOCAN 2020, il existe une grande variation géographique de l'incidence et de la mortalité du CCR entre les différents pays du monde. Il a été reconnu que l'augmentation la plus significative de l'incidence et de la mortalité du CCR se produit dans les pays à indice de développement humain (IDH) moyen et élevé qui adoptent le mode de vie « occidental ». Les pays développés sont les plus à risque de cancer du côlon. L'obésité, le mode de vie sédentaire, la consommation de viande rouge, l'alcool et le tabac sont considérés comme les facteurs moteurs de la croissance du CCR (**WHO, 2020**). Par conséquent, le cancer colorectal est une maladie des pays développés ayant un mode de vie occidental. Les facteurs qui influencent l'espérance de vie, y compris les comportements liés à la santé (tabagisme, obésité et exercice) et les facteurs sociaux (éducation, revenu et dépenses gouvernementales en matière de santé), ont un impact profond sur le développement du cancer. Les niveaux d'espérance de vie doivent être pris en compte lors de l'élaboration de stratégies de prévention et de traitement du cancer (**Chetty et al., 2016**).

Dans 95% des cas, les sujets atteints ont plus de 50 ans avec un âge moyen de 70 ans au moment du diagnostic chez l'homme, et 73 ans chez la femme (**has-sante.fr. 2012**)

De nombreux travaux ont attiré l'attention sur le fait que la survie au cancer colorectal dépend du stade auquel il est diagnostiqué, le diagnostic à un stade avancé ayant une survie plus faible (**Wong et al., 2020**). Le taux de survie à cinq ans est de 90% pour les cancers colorectaux diagnostiqués à un stade précoce, contre 13% pour ceux diagnostiqués plus tard. Entre 0 et 74 ans, le risque cumulatif de mourir d'un cancer du côlon est de 0,65 % chez les hommes et de 0,45 % chez les femmes (**Amersi et al., 2005**). Les taux de mortalité (mondiaux) normalisés selon l'âge pour 100 000 membres du CCR chez les deux sexes sont de 8,9 % (**Arnold et al., 2017**).

II. 4. 2 Facteurs de risque et facteurs de protection

➤ **Facteurs de risque**

De multiples facteurs ont été impliqués dans le développement du cancer colorectal. Il a été démontré que les individus courent un risque accru de CCR si ils (ou leurs proches) ont eu un cancer, des antécédents de polypes du côlon, des maladies inflammatoires de l'intestin, le diabète sucré ou la cholécystectomie (**Sawicki., 2021**).

Les facteurs de risque sont classés du plus important au moins important. Mais généralement, il est impossible de les classer avec une certitude absolue :

- **Alcool**

Les personnes qui buvaient 45 grammes (environ 3 verres) d'alcool par jour avaient 1,5 fois plus de risques de développer un cancer colorectal que les non-buveurs. L'alcool augmente le risque chez les hommes et les femmes, bien que l'effet semble être plus important chez l'homme (**cancer.ca/fr**).

- **Fumer et tabac**

Fumer augmente le risque de cancer colorectal. Le risque semble augmenter avec la durée et la quantité de tabagisme (**cancer.ca/fr**).

- **Alimentation riche en viande rouge**

Une alimentation riche en viandes rouges (bœuf, porc, agneau et chèvre) augmente le risque de cancer colorectal. Le risque augmente avec la quantité de viande rouge qu'une personne mange (**cancer.ca/fr**).

- **Viande transformé**

La viande transformée est une viande qui a subi une transformation soit par fumage, séchage, salage pour les conservées ou bien on leur ajoute de conservateurs tels que le nitrite ou le nitrate. Manger de la viande transformée augmente le risque de cancer colorectal, et ce risque augmente avec la quantité consommée (**cancer.ca/fr**).

- **Alimentation faible en fibre**

Une alimentation pauvre en fibres augmente le risque de cancer colorectal. Les preuves suggèrent que la consommation d'aliments contenant des fibres alimentaires peut protéger contre le cancer colorectal ([cancer.ca/fr](#)).

- **Comportement sédentaire**

Un comportement sédentaire fréquent (assis pendant de longues périodes) est associé à un risque accru de cancer colorectal, en particulier de cancer du côlon distal et du rectum.

- **Maladie inflammatoire de l'intestin (MII)**

Les MII touchent le revêtement de tube digestif, provoquant une inflammation, entraînant des ulcères et des saignements. La colite ulcéreuse et la maladie de Crohn sont les deux types de MII les plus courants. La colite ulcéreuse est plus susceptible d'augmenter le risque de cancer colorectal que la maladie de Crohn. Le risque augmente avec la durée de l'MII et l'étendue de l'MII dans le côlon ([cancer.ca/fr](#)).

- **Diabète**

Les patients atteints de diabète de type 2 ont une incidence plus élevée de cancer colorectal. Il existe un lien entre les deux car les facteurs de risque du diabète - l'inactivité physique et le surpoids ou l'obésité, sont également des facteurs de risque du cancer colorectal ([cancer.ca/fr](#)).

- **Antécédents personnels de cancer du sein, de l'ovaire ou de l'utérus**

Les femmes qui ont déjà un cancer du sein, des ovaires ou de l'utérus ont un risque plus élevé de développer un cancer colorectal. Ce risque accru peut être dû à des facteurs de risque courants, notamment le syndrome de Peutz-Jeghers, le syndrome de Lynch ou certains autres syndromes génétiques ([cancer.ca/fr](#)).

- **l'âge adulte**

Plusieurs études suggèrent que la taille est un facteur de risque de cancer du côlon, mais peut ne pas être un facteur de risque de rectum. Les chercheurs pensent que cela est dû aux effets de l'hormone de croissance et de la puberté ([cancer.ca/fr](#)).

- **Exposition aux rayonnements ionisants**

Les personnes exposées aux rayonnements ionisants, comme lors du bombardement atomique du Japon, ont un risque accru de développer un cancer colorectal, en particulier un cancer du côlon. Les personnes qui ont subi une radiothérapie pour un cancer courent un risque plus élevé de développer un cancer colorectal ([cancer.ca/fr](#)).

- **Embonpoint ou obésité**

Le cancer colorectal est plus fréquent chez les personnes en surpoids ou obèses que chez les personnes de poids normal. Indice de masse corporelle (IMC) élevé augmente le risque chez les hommes et les femmes, bien que les hommes semblent être plus à risque.

- **Polypes dans le côlon et le rectum**

Des antécédents personnels ou familiaux de polypes dans le côlon, le rectum ou les deux augmentent considérablement le risque de cancer colorectal. Les polypes colorectaux se forment généralement dans la muqueuse du côlon ou du rectum. Les adénomes (polypes adénomateux) sont des polypes qui peuvent devenir cancéreux, Le risque de développer un cancer colorectal à partir de polypes adénomateux est lié au type, à la taille et au nombre de polypes (**cancer.ca/fr**).

- **Polypose adénomateuse familiale (PAF)**

La PAF est une maladie génétique rare généralement causée par des mutations du gène du polype adénomateux du côlon (APC). La PAF se caractérise par la formation de centaines ou de milliers de polypes adénomateux sur la muqueuse (muqueuse) du côlon et du rectum. Ces polypes peuvent apparaître dès la puberté. Sans traitement pour la PAF, la plupart des personnes atteintes de PAF développeront un cancer colorectal avant l'âge de 40 ans (**cancer.ca/fr**).

La polypose adénomateuse atténuée familiale (PAF atténuée) est un sous-type de PAF. Les patients atteints de PAF ont moins de polypes adénomateux du côlon que les patients atteints de PAF classique, et ces polypes ont tendance à apparaître plus tard dans la vie. Le cancer colorectal survient généralement chez les personnes âgées dont le PAF est affaibli (**cancer.ca/fr**).

- **Facteurs de protection**

Une activité physique régulière (environ 30 minutes par jour) réduit le risque de développer un CCR. Les aliments dont il a été démontré qu'ils préviennent ce type de cancer : calcium (plus précisément le lait), divers fruits et légumes frais (fibre). Consommation quotidienne recommandée de 5 fruits et légumes par jour. Ainsi l'utilisation régulière d'aspirine ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et le traitement hormonal substitutif chez les femmes ménopausées (**Finlay et Macrae, 2022**).

II. 4. 3. Traitements

Le choix d'un traitement du CCR dépend de son stade, de la localisation et de l'état général du malade. L'objectif du traitement varie en fonction du type de traitement choisi et du stade du cancer (**e-cancer.fr, 2021**):

- Enlever la tumeur ou les métastases, ou réduire leur taille.

- Ralentir le développement de tumeurs ou de métastases.
- Diminuer le risque de récurrence,
- Prévention et traitement des symptômes et des complications causés par la maladie pour Améliorer la qualité de vie du malade.

➤ **Ablation de la tumeur au cours d'une coloscopie**

Pendant la coloscopie, les polypes identifiés sont prélevés puis analysés. Ceux qui se sont avérés précancéreux ou cancéreux superficiels (situés sur la muqueuse) n'ont pas nécessité d'intervention complémentaire : leur ablation était en soi curative. D'autre part, si l'analyse indique la présence de cellules cancéreuses aux marges du tissu échantillonné ou la profondeur dans la paroi, des interventions chirurgicales supplémentaires devront généralement être planifiées (fondation-arc.org,2021).

➤ **Chirurgie**

La chirurgie est souvent le principal traitement des cancers du côlon à un stade précoce. Le type de chirurgie utilisé dépend du stade (étendue) du cancer, de sa localisation dans le côlon et de l'objectif de la chirurgie. Cependant, tout type de chirurgie du côlon doit être effectué sur un côlon propre et vide. Le malade sera mis à suivre un régime spécial avant la chirurgie et peut avoir besoin d'utiliser des boissons laxatives et/ou des lavements pour retirer toutes les selles de côlon. Cette préparation intestinale ressemble beaucoup à celle utilisée avant une coloscopie (cancer.org, 2020).

La chirurgie consiste à enlever la zone du côlon qui contient la tumeur et une marge de sécurité d'au moins 5 cm autour de la tumeur afin qu'aucune cellule cancéreuse ne reste. Selon la localisation de la tumeur et son évolution, la zone prélevée est plus ou moins importante (fondation-arc.org,2021):

- **L'hémi-colectomie** droite ou gauche est nécessaire lorsque la tumeur est respectivement dans le côlon droit ou gauche. Ce geste consiste à retirer la moitié droite ou gauche du côlon ainsi que la moitié adjacente du côlon transverse.
- On parle de **sigmoïdectomie** lorsque des tumeurs localisée sur la partie terminale (sigmoïde) du côlon.
- Dans certains cas très avancés, il est nécessaire de retirer la totalité du côlon : on parle de **colectomie** totale.
- **Proctectomie** : pour les tumeurs localisées au niveau du rectum.

➤ **La chimiothérapie**

La chimiothérapie consiste à administrer à un patient une ou plusieurs molécules destinées à détruire le plus spécifiquement possible les cellules cancéreuses. Elle peut être prescrite à tous les stades de la maladie, sauf carcinome in situ. Pour les tumeurs avancées, il est recommandé après la chirurgie pour réduire le risque de récurrence : c'est ce qu'on appelle la chimiothérapie adjuvante. Enfin, pour le cancer colorectal métastatique, la chimiothérapie est systémique, soit avant le premier acte chirurgical pour faciliter la chimiothérapie, soit à la place de la chirurgie lorsque celle-ci n'est pas possible (**fondation-arc.org, 2021**).

➤ **Les thérapies ciblées**

Les thérapies ciblées, sont des molécules développées conçues pour bloquer des mécanismes spécifiques par lesquels les cellules cancéreuses se développent ou prolifèrent. Ces traitements sont administrés en cures espacées d'une à deux semaines dans le traitement des tumeurs métastatiques, le plus souvent en complément de la chimiothérapie.

Les molécules les plus anciennes et les plus utilisées sont ce qu'on appelle des anticorps monoclonaux, des médicaments utilisés pour attaquer les tumeurs de la même manière que le corps produit pour tuer les virus ou les bactéries :

- Le bévacizumab (Avastin®), l'aflibercept (Zaltrap®) et le régorafénib (Stivarga®) bloquent l'action d'un facteur qui contribue à la vascularisation de la tumeur (appelé VEGF), ce qui freine son développement.
- Le cetuximab (Erbix®) et le panitumumab (Vectibix®) ciblent le récepteur de l'EGF qui est un facteur de croissance situé à la surface des cellules cancéreuses, ce qui freine la prolifération tumorale (**fondation-arc.org, 2021**).

➤ **La radiothérapie**

La radiothérapie est utilisée pour le cancer du rectum. Elle réduit la taille de la tumeur avant l'ablation chirurgicale et aide à réduire le risque de récurrence locale. Ce traitement consiste à délivrer une dose de rayonnement avec une énergie qui tue les cellules cancéreuses. En plus de la chirurgie, elle est souvent associée à une chimiothérapie néo-adjuvante. La radiothérapie n'est généralement pas utilisée pour le cancer du côlon, à moins que la tumeur ne soit trop invasive pour être complètement retirée (**fondation-arc.org, 2021**).

II. 5. Impact de microbiome intestinal sur le développement de Cancer colorectal

Du fait de la localisation tumorale, le lien entre microbiote intestinal et cancer le CCR semble naturel. Pourtant, la première démonstration d'un lien fonctionnel entre le microbiome et le CCR ne remontent qu'à deux décennies. Des expériences dans un modèle de souris hétérozygote pour les mutations du gène suppresseur de tumeur ApcMin ont montré que les souris axéniques (exemptes de tous germes) ont un risque plus faible de développer des adénomes dans l'intestin par rapport aux souris témoins (Dove et al., 1997).

À ce jour, aucune relation causale directe entre une seule bactérie et le cancer colorectal n'a pas été démontrée, mais les mécanismes impliquant le microbiome dans la carcinogenèse du côlon sont de mieux en mieux compris. Selon le modèle « driver-passenger » (Figure 07), les bactéries du microbiote pourraient être impliquées dans la carcinogenèse.

La muqueuse colique des patients à risque de CCR est intrinsèquement colonisée par des espèces pathogènes du genre *Bacteroides* (tel que *B. fragilis* entérotoxigènes (ETBF)) ou de la famille des entérobactéries ou par d'autres bactéries qui peuvent jouer le rôle de 'driver' du CCR, ces facteurs peuvent provoquer une inflammation, une prolifération cellulaire accrue et/ou la production de substances génotoxiques qui contribuent à des mutations au cours de l'adénocarcinome.

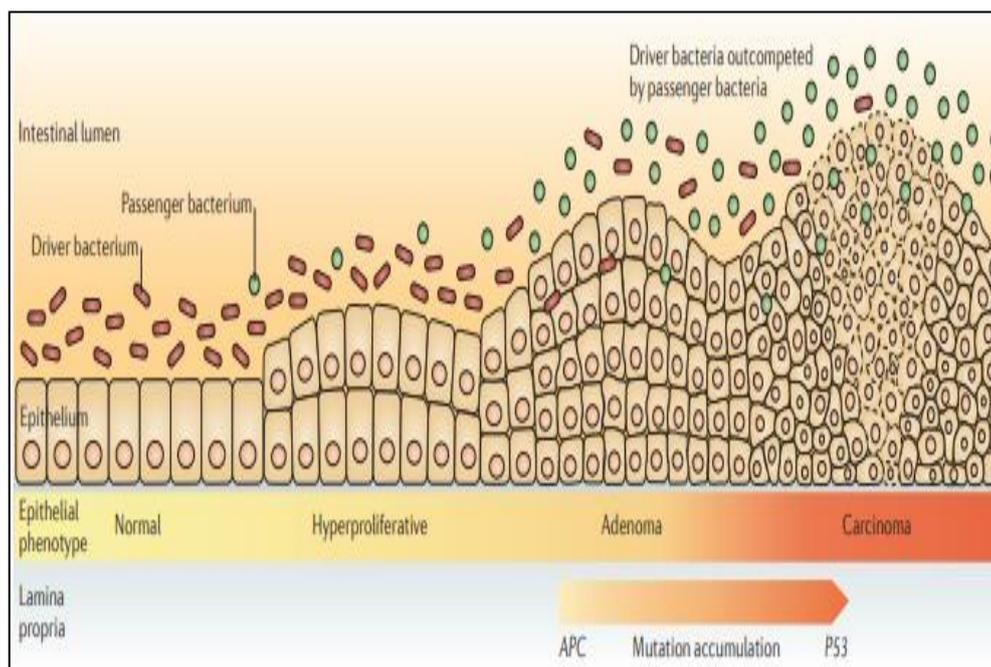


Figure 07 : Un modèle bactérien driver–passenger pour le cancer colorectal (Tjalsma et al., 2012).

La première étape est la colonisation de l'intestin par des bactéries conductrices (driver) pathogènes à potentiel pro-inflammatoire et pro-cancérigène (notamment *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*), qui vont contribuer au développement du cancer colorectal. La progression tumorale entraînera alors des modifications du microenvironnement tumoral, permettant la colonisation par des bactéries passagères (passenger) opportunistes (tel que *F. nucleatum*, *Streptococcus gallolyticus*) (**Tjalsma et al., 2012**).

Des études récentes ont porté sur la composition du microbiome humain, en comparant notamment le microbiome intestinal de sujets sains et de patients atteints de cancer CCR. Il y avait des différences significatives dans la distribution des différentes bactéries dans la muqueuse colique et les matières fécales. Ces différences semblent affecter un certain nombre de taxons, désormais bien identifiées.

Dans une étude menée par **Burns et al.** 44 microbiomes de sujets sains et de 44 patients atteints de CCR ont été séquencés et comparés sur la base d'échantillons de tissus du côlon, ils ont observé un enrichissement en *Proteobacteria* (en particulier *Providencia*) et réduction des *Firmicutes* et *Bacteroidetes* dans la population touchée (**Burns et al., 2015**).

D'autres bactéries ont été impliquées dans la carcinogenèse du côlon (*Parvimonas micra*, *Solobacterium moorei* et *Peptostreptococcus stomatis*), mais avec des signaux biologiques plus faibles (**Yu et al., 2015**).

Des différences de composition du microbiome ont également été mises en évidence selon le stade évolutif de formation tumorale (absence de tumeur, adénome, carcinome). Des taux élevés de *Bacteroides*, d'*Escherichia coli* et de *Streptocoques* ont été identifiées au stade carcinome (**Feng et al., 2015**). De plus, des gènes de virulence plus abondants ont été observés au stade carcinome par rapport au stade adénome. L'identification de ces gènes de virulence et de ces bactéries impliquées dans la carcinogenèse pourrait fournir des outils de dépistage non invasifs du CCR, ainsi que des cibles thérapeutiques potentielles.

Z. Wei et al. ont étudié Microbiome des patients cancéreux à différents stades Maladie (survie, rechute, décès). Dans chaque groupe, 4 branches : *Protéobactéries* (33,8–49,4%), *Firmicutes* (16,9–22,7 %), *Bacteroidetes* (21,1–27,9 %) et *Fusobacterium* (3,38–10,8%), confirmant les données de **Burns et al.** Une augmentation de *B. fragilis* a été observée dans Patients qui n'ont pas survécu par rapport aux survivants. *Fusobacterium nucleatum* est plus abondant. En revanche, noté chez les patients présentant une récurrence du cancer La raison du

survivant. Dans le même temps, l'abondance de *F. prausnitzii* plus chez les survivants que chez les non survivant. Des niveaux élevés de *Clostridium nucleatum* et de *B. fragilis* ont associés à une diminution de la survie globale. Des bactéries qui construisent un hypothétique microbiome Constituera un biomarqueur prédictif de survie L'évolution du cancer colorectal, péjorative dans le cas de *F. nucleatum* et *B. fragilis*, tandis que la présence de *F. prausnitzii* constituerait plutôt un bon marqueur pronostique (Wei et al., 2016).

I. Objectif de l'étude

Cette étude a été effectuée sur des patients atteints d'un cancer colorectal au niveau du service oncologie de l'EPH d'Amizour. Un échantillonnage de la matière fécale ainsi qu'une récolte de données sur les patients a été effectuée durant une période d'un mois, allant d'avril 2022 à mai 2022.

L'analyse des échantillons a été réalisée au niveau de laboratoire de Génie Biologique des Cancers de la Faculté de Médecine de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia (campus Aboudaou).

I.1. Population cible

L'étude est basée sur 29 patients atteints de cancer colorectal, dans la région de Bejaia, âgée de 30 ans à 70 ans de différent sexe. Le principal critère de choix d'un patient est de ne pas avoir une stomie digestive (colostomies), car ces derniers ont une flore bactérienne contaminée par la stomie ce qui ne représente pas le microbiote des patients sans stomie.

I.2. Récolte des informations sur les patients

Au service d'oncologie, des informations sur 40 patients ont été recueillies. 29 patients au total ont accepté, parmi eux 13 donneurs d'échantillon (Matière fécale). Les sources des informations collectées de chaque patient ont été obtenues par deux manières :

- Traitement des dossiers médicaux de patients du service d'oncologie d'EPH d'Amizour, pour collecter les différentes données renfermant : âge, sexe, les antécédents médicaux et familiaux, siège de cancer, extension métastatique, le type et le nombre de chimiothérapie prise, la présence d'une infection préalable, traitement aux antibiotiques, et l'opération chirurgicale.
- Elaboration d'un questionnaire afin d'avoir le maximum d'information sur l'alimentation, les habitudes toxiques et le mode de vie de chaque patient questionnaire en **Annexe N° I**.

I.3. Echantillonnage

L'échantillonnage ainsi que le transport de matière fécale, ont été réalisés en condition d'asepsie

Parmi les 29 patients seulement 13 d'entre eux ont accepté de nous donner leur matière fécale indispensable sur laquelle on va travailler, tandis que dans ces 13 échantillons 3 d'entre

eux sont utiliser pour l'analyse microbiologie classique et 10 sont diriger vers une étude moléculaire.

Ces patients reçoivent un consentement et une explication sur l'objet de notre étude afin de nous donner leur approbation par une signature montrant leur accord pour récolter l'échantillon qu'on a besoin pour notre étude suive d'un questionnaire pour savoir leur mode de vie, leur alimentation et, leur antécédent médicaux. Une boîte de coproculture stérile leur a était donner en montrant la manier de son utilisation afin d'éviter la contamination de la matière fécal les boites sont étiqueter montrant la date et l'heure de prélèvement, le sexe de patient.

I.4. Transport est stockage

Les échantillons étiquetés sont acheminés au laboratoire GBC, (Faculté de Médecine de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia) par une glacière à une température de 4°C, appendant une durée de 45 min, puis conservés au réfrigérateur à une température de -20°C.

Les échantillons dirigés pour une étude microbiologique classique ont été analysé sur place à l'arrivage au laboratoire. Ils ont été conservés qu'après l'ajoute d'un cryoprotecteur (glycérol).

II. Analyse microbiologique

II.1. Milieux de cultures utilisées

- Gélose nutritive
- Bouillon nutritive
- Gélose au sang cuite
- Gélose Chapman
- Gélose au sang frais
- Gélose EMB (Éosine Methylene blue)
- Gélose BEA (Bille, Esculine, Azoture)
- Gélose PCA (Plate Count Agar)
- Gélose MacConkey

➤ Préparation des dilutions

- Peser 10 gramme de selle frais pour avoir un échantillon représentatif dans des conditions stérile en utilisant une spatule métallique, un vert de montre, et une balance sous une PSM (Poste Sécurité Microbiologique).
- Mettre environ 10 gramme de salles dans des flacons étiqueter qui contient 90 ml d'eau physiologique
- Vortexer jusqu'à ce que les milieux soit homogène.

II.2. Dénombrement de la flore totale (isolement et criblage)

- ✓ Préparation des dilutions : Des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-7} ont été réalisées pour diminuer la charge des microorganismes. Afin d'avoir une charge microbienne quantifiable permettant d'effectuer un dénombrement à l'œil nu.
- ✓ Ensemencement par méthode de râeaux dans des boites de pétri en partant de 10^{-1} a 10^{-7} sur GN et PCA
- ✓ Pour chaque dilution on utilise 3 boites.
- ✓ Pipeter grâce à une micropipette 100 μ l (0.1 ml) de solution dans chaque dilution et la mètre en centre de la gélose.



Figure 08 : Photographies: étapes de préparation de la solution mère

- ✓ Etaler convenablement la suspension sur toutes la gélose et d'une manier homogène. Refaire la même procédure pour les trois boites et pour chaque dilution.
- ✓ Incuber à 37°C pendant 24H.
- ✓ Après 24H d'incubation Vien le passage ou dénombrement.

II.3. Réalisation des repiquages

Des repiquages successifs sont réalisés afin de purifier les souches isolées. Des colonies morphologiquement bien distingués prélèvera partir des milieux de culture sélectifs (EMB, Mc Conkey, Chapman, BEA) préparée au préalable, ont été repiqué sur des milieux GN et PCA, puis incubées à 37°C pendant 24h.

II.4. Recherche des germes pathogène

La recherche est basée à identifier des genres bactériennes qui contient des espèces opportunistes et pathogènes susceptibles d'être la cause de développent d'un CCR ou de graver l'état de santé de patient.

II.4.1. Coloration de gram

Réalisé par prélèvement d'une colonie bien isolée et l'incorporer dans une goutte d'eau physiologique stérile, faire sécher la lame dans la flamme du bec bunsen puis la recouvrir des colorants : violet de gentiane (1 min), lugol (1 min), alcool (5 secs), et la fushine (1 min), en respectant le lavage à l'eau distillée entre chaque étape de coloration. L'observation sous microscope optique au grossissement 10x100 est faite à l'aide de l'huile à immersion.

Observation microscopique : Coloration des bactéries gram+ en violet, et gram- en rose.

II.4.2. Teste de catalase

Consiste à déposer une colonie à l'aide d'une pipette pasteur sur une gouttelette d'eau oxygénée (H₂O₂). La catalase est une enzyme qui dégrade l'H₂O₂ en eau et dioxygène.



Observation :

Présence d'effervescence : bactérie a catalase+.

Absence d'effervescence : bactérie a catalase-.

II.4.3. Test de l'oxydase

A l'aide de pinces, on place un disque d'oxydase sur une lame porte objet. On choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester puis on prélève la colonie choisie à l'aide d'une pipette pasteur. On frotte doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette après 30 secondes. La lecture ce fait comme suite :

Réaction positive : apparition d'une coloration bleu foncé à violet.

Réaction négative : absence de coloration.

II.4.4. Galerie biochimique

L'identification des souches isolées à partir des repiquages est basée sur les caractères biochimiques après avoir réalisés une galerie biochimique classique.

➤ Fermentation du glucose, lactose, la production de gaz et de H₂S

On prélève quelques colonies d'une culture pure, dans 5 ml d'eau physiologique pour préparer une suspension bactérienne, puis on inocule la pente de milieu KIA avec des stries serrées et culot par simple piqure centrale. On incube à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats est faite comme suit :

- ✓ Fermentation de glucose : couleur jaune du culot.
- ✓ Fermentation du lactose : virage de couleur de la pente au jaune.
- ✓ Production d'H₂S : noircissement du milieu ou apparition d'un précipité noir ou dessous de la pente.
- ✓ Production de gaz : apparition de bulles de gaz, se traduit par le soulèvement ou craquement de la gélose.

➤ Recherche du nitrate réductase

Le bouillon nitraté nous permet de mettre en évidence la nitrate réductase qui réduit le nitrate (NO₃) en nitrite (NO₂). A partir de la suspension bactérienne, onensemence le bouillon et on incube à 37°C pendant 24h. Après l'incubation on ajoute quelques gouttes de deux réactifs : NRI et NRII avec une légère agitation.

Une nitrate réductase positive se traduit par l'apparition d'une coloration rouge (stade nitrite). Si le résultat est négatif, on ajoute la poudre de Zinc au milieu et laisser agir pendant 3 min. une réaction négative se traduit par le virage du milieu au rouge (présence des nitrates) et si la couleur ne change pas cela confirme que la souche produit une nitrate qui réduit le nitrate jusqu'au stade d'azote N₂.

➤ Etude de type fermentaire (Test VP et RM)

Le milieu Clark et Lubs nous permet de mettre en évidence la voie de fermentation du glucose. Le milieu estensemencé à partir d'une suspension bactérienne faible et incubé à 37° C pendant 24h. Après incubation, le contenu de chaque tube est divisé en 2 tubes. La lecture se fait comme suit :

- ✓ **Test RM (rouge de méthyle) :** on ajoute 5 gouttes du réactif RM, un virage au rouge indique une réaction RM positive (la voie des fermentations acides mixtes).
- ✓ **Test VP (Voges-Proskauer) :** on ajoute 5 gouttes de VPI et 5 gouttes de VPII. Puis on agite doucement et laissé 10 min. Une coloration rouge cerise indique une réaction positive (production d'acétoïne produit par fermentation butane-diolique).

➤ **Utilisation de Citrate**

On prélève une colonie bien isolée et on ensemence le milieu de citrate de Simmons par des stries. L'incubation est effectuée à 37 °C pendant 24h à 3 jours. L'utilisation du citrate se traduit par un virage de la couleur du milieu de vert au bleu due à l'alcalinisation.

➤ **Recherche de l'uréase, de la TDA et la production d'indole**

On ensemence le bouillon urée-indole à partir de la suspension bactérienne, et on incube à 37°C pendant 24h. En présence de l'uréase le milieu vire au rouge violacé. Les tubes sont ensuite divisés en deux pour la mise en évidence de tryptophanase désaminase et de l'indole :

- ✓ **La production d'indole** se traduit par l'apparition d'un anneau rouge en surface après avoir ajouté 4 à 5 gouttes du réactif de Kovacs.
- ✓ **La révélation de TDA** est réalisée en ajoutant 1 à 2 gouttes de réactif TDA (Ferric Chloride Solution). Une coloration brun rouge signifie TDA+, et une coloration jaune orangée signifie TDA-.

III. Analyse moléculaire

Les tests moléculaires sont réalisés sur 10 échantillons (matière fécale) afin d'extraire l'acide nucléique (ARN ribosomique 16S) de la flore bactérienne des patients atteints d'un CCR, puis diriger les résultats d'extraction pour une électrophorèse sur gel d'agarose suivie d'une qRT-PCR pour identifier certaines souches bactérienne.

III.1. Extraction de l'ARN

Trois protocoles d'extraction ont été réalisés afin de prendre ceux avec les meilleurs résultats

III.1.1. Protocole d'extraction 1 : Trizol-Lysozyme

Etape 1 : Préparation de la solution de lysozyme Pour une solution de concentration $C = 10 \text{ mg/ml}$:

- Avec une balance de haute précision, on pèse 1 mg de lysozyme lyophilisée (**Figure 09**) et les mettre dans un tube eppendorf stérile.
- ajoute 100 μ l de Tris-HCl (pH= 8 ; 10mM) au lysozyme peser.
- On vortex jusqu'à dissolution complète du lysozyme dans le Tris-HCl.



Figure 09 : Lysozyme Lyophilisée

Etape 2 : Préparation des échantillons de matière fécale :

- les échantillons conservé a -20°C ont été décongelé a une température ambiante.
- Pour un volume final de 1.5 ml de solution d'échantillon dans un eppendorf ; on pèse 0.3 g de matière fécale et y ajouter 1.2 ml d'eau physiologique.
- Vortexer le mélange jusqu'à homogénéisation
- Centrifuger à 800 rpm pendant 10 mn puis éliminer le surnageant.
- Suspendre le culot dans 200 μ l de Tris-HCl et bien Vortexer.
- on ajoute 25 μ l de solution de lysozyme (10mg/ml de 10mM Tris-HCl ; pH= 8) puis Incuber à 37°C pendant 30 mn.

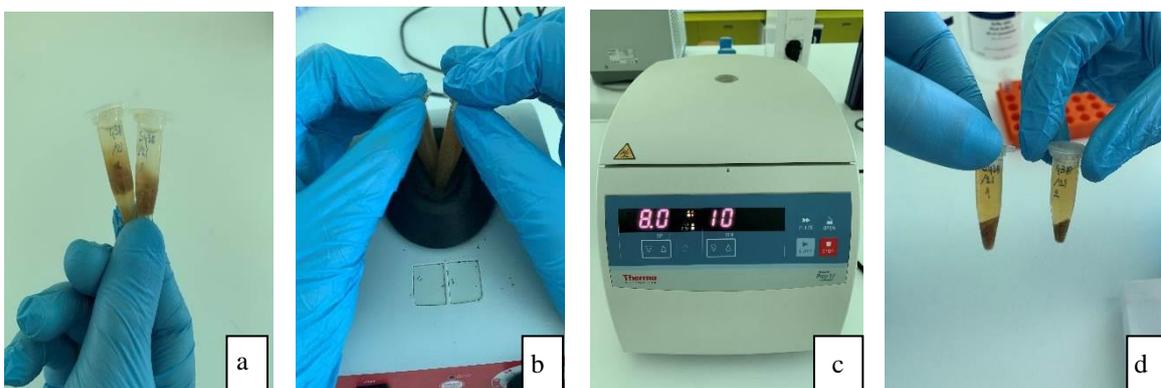


Figure 10 : Etapes de préparation de suspension de la matière fécale

Etape 3 : Extraction au Trizol :

- on centrifuge l'échantillon à 9000 rpm pendant 5 mn puis transférer le surnageant dans un eppendorf propre.
- Prendre 100µl de surnageant et on ajoute 400µl de Trizol (**Figure 11**), et bien mélanger en vortexant.

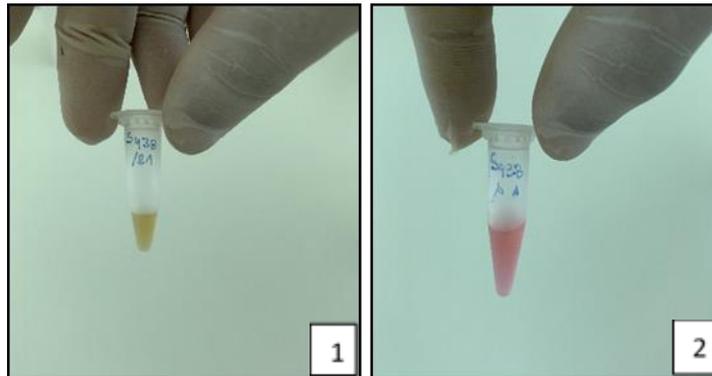


Figure 11 : Surnageant (1), et après l'ajout de Trizol (2)

- Ajouter au mélange 100µl de chloroforme (pour la séparation en deux phases, aqueuses et organiques) puis on mélange en inversant le tube 4 à 5 fois, et laisser reposer sur paillasse 1 à 2 mn.
- Centrifuger à 12.000 rpm à 4°C pendant 15 mn (**Figure 12**).

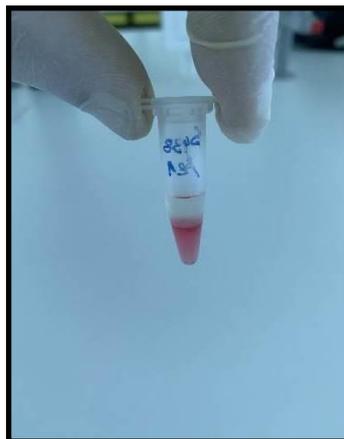


Figure 12 : Résultats de centrifugation

- Délicatement, à l'aide d'une micropipette, récupérer le surnageant et le transférer dans un tube propre.

- On ajoute au surnageant 250µl d'isopropanol et Vortexer puis incuber 10 mn à température ambiante, puis on transfère le mélange dans une colonne d'extraction.
- **Faire un premier lavage :** Ajouter 250µl de tampon de lavage 1 (AW1) et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 mn. puis Jeter le contenu du tube de collection.
- **Faire un deuxième lavage :** Ajouter 250µl de tampon de lavage 2 (AW2) et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 mn. puis jeter le contenu du tube de collection.

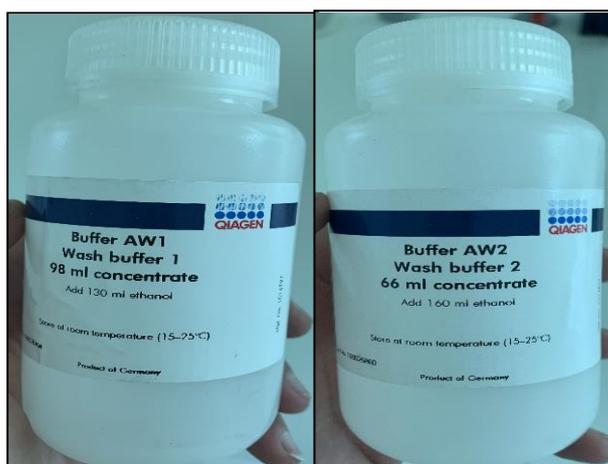


Figure 13 : Tampon de lavage Buffer AW 1 et AW 2 utilisés

- Réalisation d'élution : transférer la colonne dans un Eppendorf propre. Ajouter 60µl de solution d'élution (eau ultra pure) et laisser reposer sur paillasse pendant 1 min puis centrifuger à 12.000 rpm pendant 1 mn.
- Récupérer l'ependorf et mesurer l'absorbance de chaque échantillon au spectrophotomètre.

III.1.2. Protocol d'extraction 2 : QiAmp RNA Viral Kit

Le kit QiAmp RNA viral a été utilisé pour l'extraction d'ARN bactérien à partir la matière fécale.



Figure 14 : Kit d'extraction QiAmp RNA Viral

➤ **Préparation des échantillons de matière fécale :**

- les échantillons conservé a -20°C ont été décongelé a une température ambiante. Puis suivie de même étapes tel que le 1^{er} protocole (Trizol-Lysozyme)

➤ **Lacement d'extraction ou kit QiAmp RNA Viral :** réalisé par les étapes suivantes :

- Dans un eppendorf stérile on mette 560 μl de Buffer AVL (Tampon de lyse) préalablement additionné avec carrier ARN.
- On ajoute 140ul du surnageant puis passée au vortex pendant 30s.
- Dans un thermo-mixer on incube à 37°C durant 30min (**Figure 15**).



Figure 15 : Thermo Mixer C

- Faire une centrifugation rapide (2000 rpm/ 1 min)
- Ajouter 560ul de l'éthanol (95%) puis vortexer pour bien homogénéisé.
- Dans une colonne d'extraction (Figure) stérile (permettre de purifier L'acides nucléiques par fixation sur le filtre de Tube collecteur), on transfert 630 μl de la solution précédente.
- Centrifuger a 800rpm pendant 1 min. puis on change le tube de collection.



Figure 16 : Colonne d'extraction des acides nucléiques

➤ **Réalisation du lavage 1 :**

- On ajoute 500ul de buffer AW₁ Buffer (tampon de lavage 1).
- Centrifugation a 8000 rpm pendant 1min.
- Changer le tube de collection.

➤ **Réalisation du lavage 2 :**

- On ajoute 500ul de buffer AW₂ Buffer (tampon de lavage 2).
- Centrifugation a 14000 rpm pendant 3min.
- Changer le tube de collection puis on centrifuge à 1400rpm pendant 1min.

➤ **Réalisation d'élution :**

- On met la colonne dans un eppendorf stérile puis 60ul de Buffer AVE (solution d'élution)
- Laisser reposer à température ambiante pendant 1 min puis centrifuger à 8000rpm pendant 1 min
- Puis on passe au spectrophotomètre (BioDrop).

III.1.3. Protocol d'extraction 3 : QiAmp RNA Viral / Lysozyme

Après avoir eu des résultats peu convenants sur le spectrophotomètre, un troisième Protocol a été réalisé par l'ajoute d'une solution de lysozyme au premier Protocol.

La préparation des échantillons de matière fécale et la solution de lysozyme ont été suivies par la même procédure que le protocole 1.

➤ **Lancement d'extraction kit-lysozyme**

- Après avoir préparé les échantillons de matière fécale et séparé le culot de surnageant, on ajoute au culot 200ul de Tris-HCL, et Vortexer pour bien homogénéiser.
- On ajoute 25ul de solution de lysozyme déjà préparé (C= 10mg/ml), puis Vortexer pendant 30 s.
- Incuber à 37°C pendant 30min dans un ThermoMixer.
- Centrifugation a 9000 rpm/ 10 min.
- On met 140ul du surnageant avec 560ul de Buffer AVL (tampon de lyse), puis on vortex.
- Laisser reposer à une température ambiante pendant 10 min.
- On ajoute 560 µl d'éthanol à 95%, puis Vortexer jusqu'à homogénéisation.
- Transfère 630 µl de la solution dans une colonne
- Centrifuger a 8000rpm pendant 1 min puis on change le tube de collection

➤ **Réalisation du lavage 1 :**

- On ajoute 500ul de buffer AW₁ Buffer (tampon de lavage 1).
- Centrifugation a 8000 rpm pendant 1 min.
- Changer le tube de collection

➤ **Réalisation du lavage 2 :**

- On ajoute 500ul de buffer AW₂ Buffer (tampon de lavage 2).
- Centrifugation a 14000 rpm pendant 3 min.
- Changer le tube de collection puis on centrifuge à 1400rpm pendant 1 min

➤ **Réalisation d'élution :**

- On met la colonne dans un eppendorf stérile puis 60ul de Buffer AVE (solution d'élution)
- Laisser reposer à température ambiante pendant 1 min puis 8000rpm pendant 1 min
- Puis on passe au spectrophotomètre (BioDrop).

I. Caractérisation de la population d'étude

I.1. Répartition des patients selon l'âge

Le nombre des patients atteints de CCR, ont été représenté en fonction de leurs âge (**Figure 17**).

On note que les patients âgés entre (50 à 80ans) sont les plus touchés par le CCR.

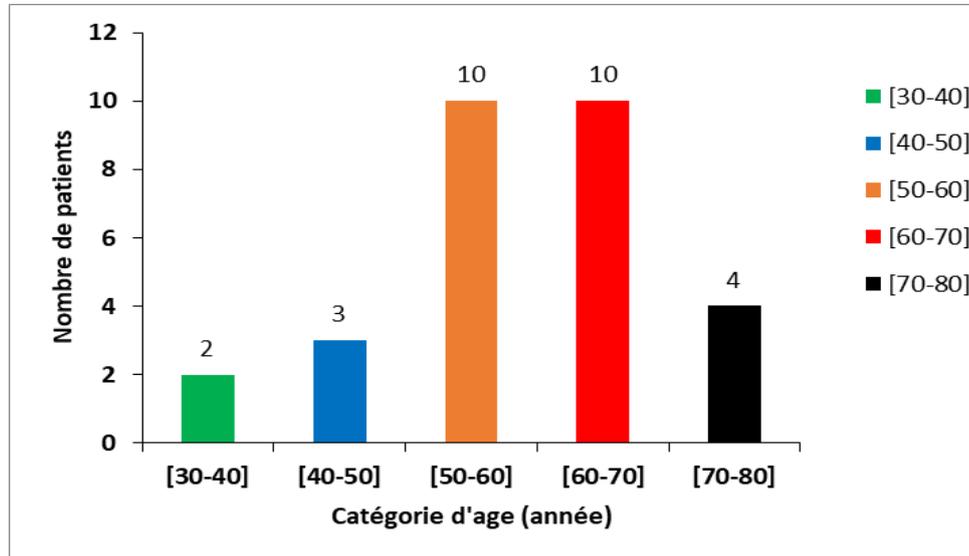


Figure 17: Répartition graphique des patients selon l'âge

L'âge est un important facteur de risque de cancer colorectal. Le cancer colorectal est rare avant 40 ans. Le risque augmente de 50 à 80 ans. La plus part des cancers colorectaux surviennent chez des personnes de plus de 50 ans. Nos résultats concordent avec ceux de (**Aparicio et al., 2005**), ou ils ont constaté que la plus part des patients atteints d'un CCR âgés sont situés de 60 ans à 75 ans.

I.2. Représentation des patients selon le sexe

Sur les 29 patients atteints par le CCR 16 sont de sexe masculin et 13 de sexe féminin. Cela montre que le risque d'être touché par le cancer colorectal est plus élevé chez le sexe masculin que féminin. D'après les résultats obtenus par **Ferlay et al., (2014)**, le CCR se situe au 2ème rang chez l'homme et au 3ème rang chez la femme en termes de mortalité .

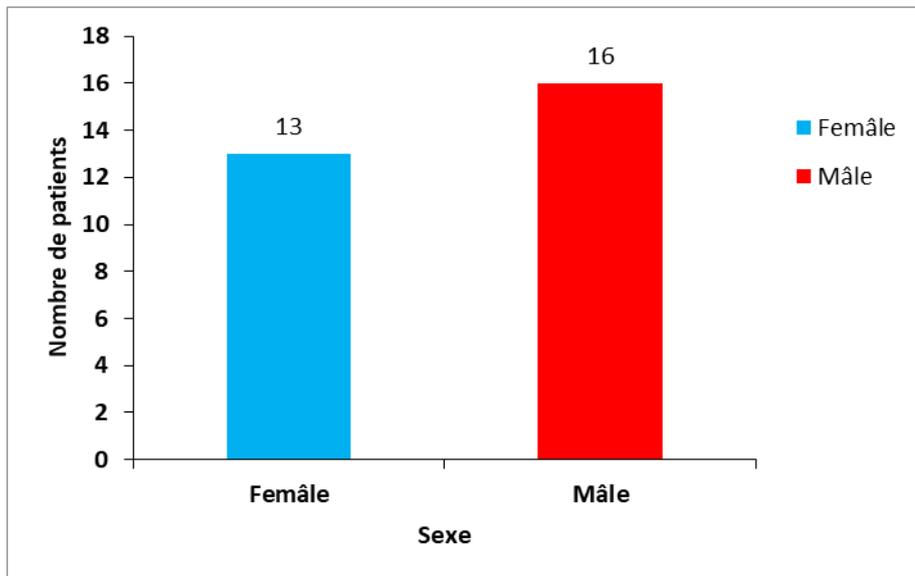


Figure 18 : Représentation des cancers colorectaux selon le sexe

I.3. Répartition des patients selon les donneurs d'échantillon

Sachant que parmi une quarantaine des patients uniquement 29 ont accepté de répondre questionnaire Sur ces 29 patients qui ont reçu le questionnaire, 12 patients ont acceptés de participer à l'étude (**Figure 20**). La principale raison qui empêche les patients de donner leur matière fécale est due à la constipation aigue et/ou chronique ou les douleurs qui touche la plus part des patients après avoir reçois des cures chimiothérapiques.

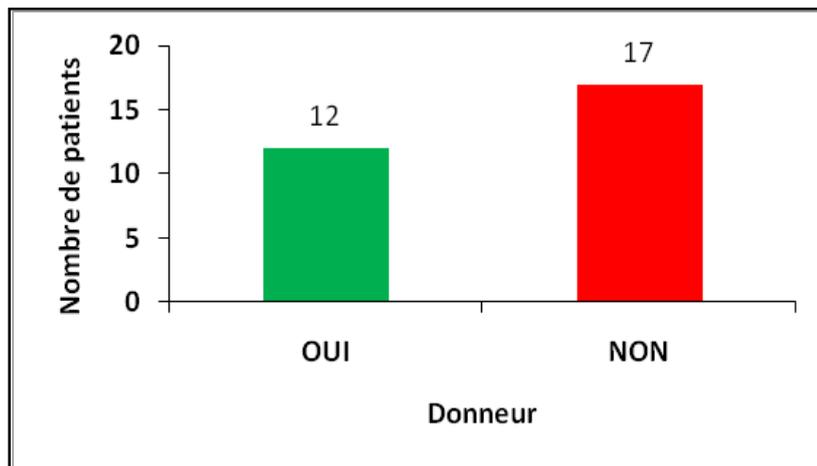


Figure 19 : Répartition des patients selon les donneurs d'échantillon

I.4. Représentation des patients selon le type de cancer

Nous avons constaté que le cancer de sigmoïde est majoritaire comparée ou autres suivie d'un taux élève et équilibré entre le cancer de rectum, du colon transverse et du colon ascendant. Ces résultats sont cohérents avec l'étude de (**Touati et al., 2020**). Qui a été réalisé sur des

patients cancer colorectaux a l'EPH d'Amizour, montrant que la localisation principal de CCR est dans le sigmoïde.

Les résultats des données ont montré que l'évolution de l'incidence du cancer colorectal qui change en fonction de la localisation tumorale, tel que les résultats qui montrent un indice plus élevée de cancer du sigmoïde Ceci est en concordance avec les données de (Chauvenet et al., 2011), qui ont montré une augmentation de l'incidence du côlon droit et du côlon gauche, et un taux élevée et stabilité globale des cancers du sigmoïde et du rectum (Figure 20).

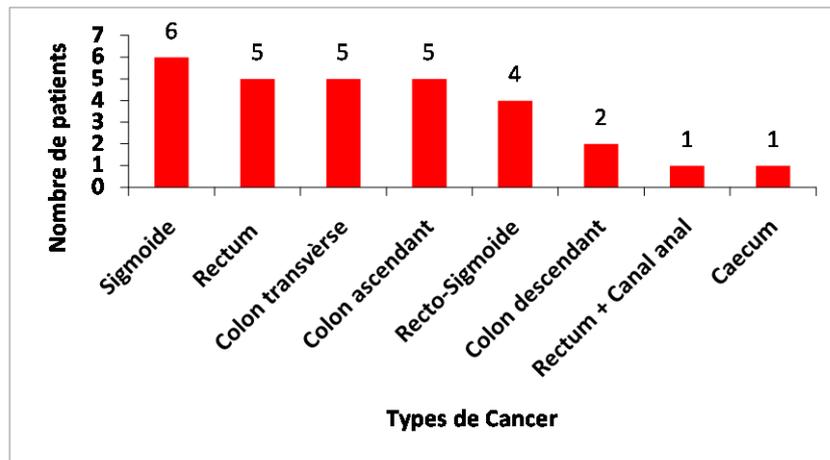


Figure 20 : Représentation des patients selon le type de cancer

I.5. Représentation des patients selon les factures de risques

Le traitement des dossiers médicaux des patients et le questionnaire entrepris ont donné les résultats dans la Figure 21. Les facteurs associés à une augmentation de risques de développement de CCR dans la population étudiée.

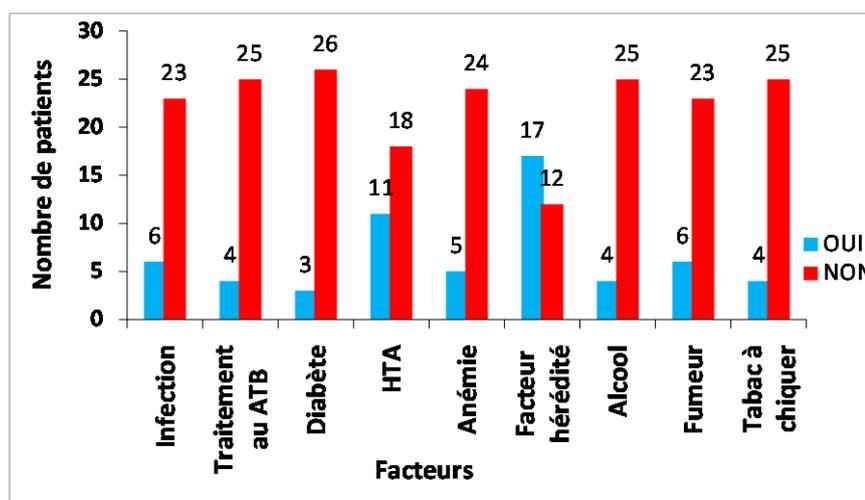


Figure 21 : Représentation graphique des facteurs de risque

Selon les résultats obtenus on remarque que le facteur héréditaire est majoritairement supérieur aux autres facteurs, 17 patients ont des antécédents familiaux de CCR. Ce la concorde avec l'étude de **Plummer et al., (2012)**, que les CCR ont une origine sporadique, mais 15 à 30% d'entre eux relèvent d'une origine familiale.

L'hypertension artérielle (HTA) et deuxième après l'hérédité de faite que parmi 29 patients ont une HTA, ce qui peut signifier qu'il y a une relation avec le cancer en le conformant avec l'étude de **Ferrara et al., (2002)** que Le principal mécanisme impliqué et sous tendant le lien entre HTA et cancer est représenté par l'angiogenèse, et notamment les facteurs antigéniques tel que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Les autre facteur sont minoritaire comparer autre mais possède une influence sur le CCR cela concorde avec le travail (**Touati et al., 2019**).

II. Analyse microbiologique

II.1. Dénombrement de la flore totale

La gélose nutritive (GN) est utilisée pour la culture d'une grande diversité de microorganismes non exigeants. Cela donne une vue sur l'ensemble des différents microorganismes cultivables colonisent le microbiome intestinal des patients.

Les résultats de dénombrement sur gélose nutritive ont été effectués sur la matière fécale après dilution (de 10^{-1} en allant a 10^{-8}) et ensemencement sur boite en triple. Les résultats obtenus sur l'échantillon 1 et 2 ont été représenté dans les tableaux I et II respectivement en utilisant la loi de dénombrement sur milieu sur milieu solide :

$$N(UFC/g) = \frac{\Sigma C}{(n1 + n2 \times 0,1)d}$$

- ΣC : Nombre total de colonies comptées dans les boites dont le nombre est compris entre 20 et 300 colonies.
- $n1$: Nombre de boite de Pétri comptées de la 1^{ère} dilution
- $n2$: Nombre de boite de Pétri comptées de la seconde dilution
- d : Facteur de dilution à partir duquel les 1^{ers} comptages ont été faits.

Tableau I : Résultats de dénombrement de la flore totale (échantillon 1)

Délutions Nbr boîte	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
	Boite 1	Ind	Ind	Ind	670	80	41	14
Boite 2	Ind	Ind	Ind	615	108	62	27	10
Boite 3	Ind	Ind	Ind	401	92	25	7	4
Moyenne	/	/	/	1686	280	128	48	20

Tableau II : Résultats de dénombrement de la flore totale (échantillon 2)

Délutions Nbr boîte	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
	Boite 1	Ind	Ind	Ind	582	38	43	7
Boite 2	Ind	Ind	Ind	507	174	17	2	9
Boite 3	Ind	Ind	Ind	602	172	19	12	3
Moyenne	/	/	/	1691	384	79	21	33

Après analyse des résultats du dénombrement sur milieux solides à savoir, la gélose nutritive et le milieu PCA. On note que es deux résultats ont montré une charge bactériennes proche l'un de l'autre.

➤ **Echantillon 1 :**

$$N(UFC/g) = \frac{280 + 128}{(3 + 3 \times 0,1) 10^{-5}}$$

$$= 1,36. 10^7 \text{ CFU/g}$$

➤ **Echantillon 2 :**

$$N(UFC/g) = \frac{384 + 79}{(3 + 3 \times 0,1) 10^{-5}}$$

$$= 1,54. 10^7 \text{ CFU/g}$$

➤ **II.2. Identification bactérienne**

Les résultats d'identification bactériens par la galerie biochimique classique sont représentés dans le **tableau III**. Ces résultats montrent une prédominance d'*Escherichia coli* Suivie de l'espèce pathogène *Shigella sp*. Notre résultats concordant avec les résultats obtenus par (**Liu et al., 2018**) qui ont montré que les genres bactériens *Escherichia-Shigella* sont les plus prédominants dans le microbiome intestinal des patients cancer colorectaux.

L'espèce *K. pneumoniae* a été identifiée dans l'échantillon de patients 2 d'après ses caractères biochimique. Sa présence a été confirmée par une galerie Api 20E (**Annexe IV**). Selon (**Strakova et al., 2021**) cette bactérie productrice de la colibactine peut être un risque de développement du cancer colorectal.

Tableau III : Résultats d'identification bactériens par la galerie biochimique (classique)

Ech	Code	Gram	Oxy	Catal	Nit	Glu	Lac	Gaz	H ₂ S	Ind	TDA	Urée	Cit	RM	VP	Espèce
E1	E1S1	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Proteus sp</i>
	E1S2	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Enterobacter sp</i>
	E1S3	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>
	E1S4	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>Shigella sp</i>
	E1S5	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>Salmonella sp</i>
	E1S6	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	<i>Citrobacter sp</i>
	E1S7	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>Klebsiella sp</i>
	E1S8	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Klebsiella sp</i>
	E1S9	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>Esherichia coli</i>
E2	E2SS1	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	E2SS2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>Esherichia coli</i>
	E2SS3	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>Esherichia coli</i>
	E2SS4	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>Shigella sp</i>
	E2SS5	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>Klebsiella sp</i>
	E2SS6	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Enterobacter sp</i>
	E2SS7	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	<i>Citrobacter sp</i>
	E2SS8	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Enterococcus sp</i>
	E2SS9	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Streptococcus sp</i>
	E2SS10	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	<i>Pseudomonas sp</i>

Après les tests complémentaires d'identification à savoir le test d'hémolyse réalisé sur le milieu gélose au sang frais, l'espèce *Streptococcus sp* a été identifiée (**Figure 22**). Cette hémolyse est caractérisée les *Streptococcus* de groupe D qui est été lentement identifier chez des patient cancer colorectaux et associé au développement de cette pathologie (**Boleij et al., 2011**).

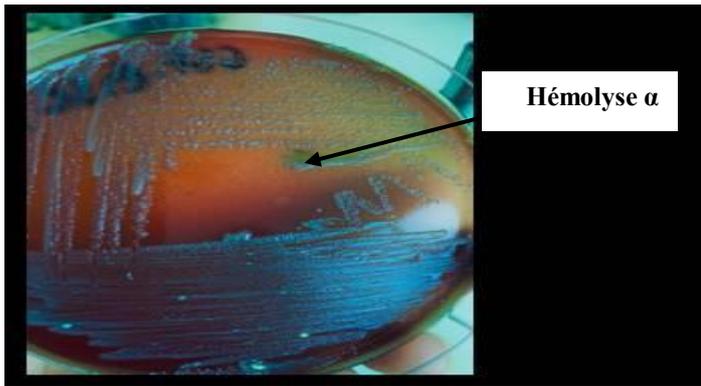


Figure 23 : Photographie montrant une hémolyse de type alpha sur gélose au sang frais.

III. Analyse moléculaire

L'analyse d'absorbance des échantillons d'extraction a été faite par 0,2 μ l dans le port de microvolume de spectrophotomètre de type BioDrop (**Figure 23**).



Figure 23 : Spectrophotomètre à microvolumes BioDrop Duo+.

Le résultat d'absorbance par le protocole Trizol-Lysozyme a donné des petits pics (**Figure 24**), alors qu'aucun pic n'a été observé avec les deux protocoles à savoir le kit QiAmp RNA Viral avec et sans Lysozyme (**Figure 25**).

Les résultats d'extractions par le protocole « Trizol / Lysozyme » sont représentés dans le **tableau IV**.

Ces résultats ne sont pas convenable, on note que les pics des échantillons « E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 » ne sont pas dans l'axe 260. Le ratio d'absorbance 260/280 est inférieur à 1,8 ce qui indique une contamination protéique. Ainsi que le ratio d'absorbance 260/230 est inférieur à 1,8, il indique la présence d'une contamination probablement causée par des composés organiques qui absorbent à une longueur d'onde de 230 nm, ces résultats coïncident avec les travaux de **William et al., (1997)**. L'utilisation de protéase K peut être efficace comme solution pour éliminer la contamination protéique ou un détergent fort tel que SDS (**Rio et al., 2010**).

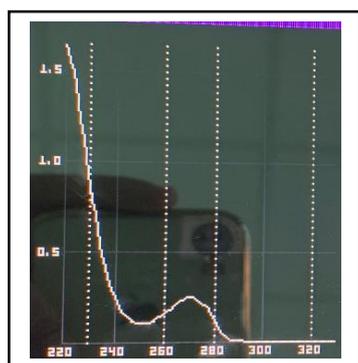


Figure 24 : Résultats d'absorbance de protocole Trizol-Lysozyme

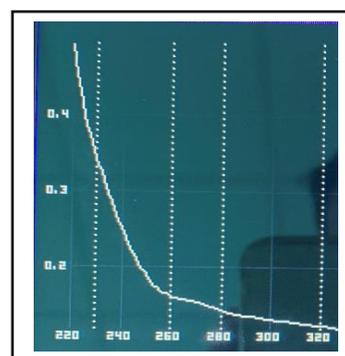
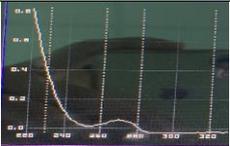
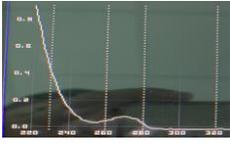
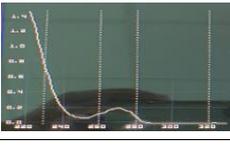
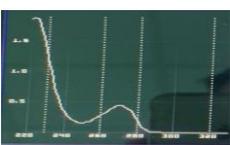


Figure 26 : Résultats d'absorbance de protocole kit QiAmp RNA avec et sans Lysozyme

Tableau IV : Résultats d'absorbance d'ARN Bactérienne par le spectrophotomètre

Echantillon	A 230	A 260	A 280	A 320	A 260/230	A 260/280	Concentration	Pique
E1	0.323	0.036	0.016	-0.023	0.171	1.513	47.20ug/ml	
E2	0.862	0.160	0.121	0.001	0.185	1.325	127.2ug/ml	
E3	1.142	0.258	0.176	-0.013	0.235	1.434	216.8ug/ml	
E4	0.194	0.015	0.004	-0.018	0.156	1.500	26.40ug/ml	
E5	0.584	0.073	0.045	-0.023	0.158	1.412	76.80ug/ml	

E6	0.371	0.029	0.012	-0.024	0.134	1.472	42.40ug/ml	
E7	0.416	0.047	0.027	-0.017	0.148	1.455	51.20ug/ml	
E8	0.728	0.110	0.079	-0.010	0.163	1.348	96.00ug/ml	
E9	1.221	0.278	0.199	-0.002	0.229	1.393	224.0	

Conclusion & perspectives

Durant le présent travail, nous avons effectué une récolte des données ainsi qu'un échantillonnage de la matière fécale des patients atteint du cancer colorectal au niveau d'EPH d'Amizour.

L'ensemble des données ont montrés que les patients âgés entre 50 à 70 ans sont les plus touchés par le CCR. Les catégories d'âges de [30- 40] et [40- 50] ont été les moins touchées par ce type de Cancer. On conclue que le CCR augmente considérablement avec l'âge. L'indice d'être touché par le CCR est plus élevée chez le sexe masculin que le sexe féminin. Le cancer de sigmoïde, cancer de rectum, cancer colon transverse et le cancer du colon ascendant ont été les cancers les plus enregistrés parmi la population étudiée. Le facteur héréditaire est plus dominant par rapport aux autres facteurs de risque avec un total de 17 patients sur 29 qui ont présenté un facteur héréditaire lié à ce type de cancer.

Le microbiome intestinal des patients étudiés présent une véritable niche des bactéries opportuniste et pathogène tel que *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* et *Salmonella*. Ainsi que les *Streptococcus* de groupe D a hémolyse alpha incomplète.

L'extraction de l'ARN a été réalisée par trois protocoles (Trizol/Lysozyme et QiAMP RNA Viral avec et sans lysozyme). Après extraction, les résultats obtenus ont montré des faibles pics d'absorption à 260-280 nm avec les protocoles d'extraction utilisés. Le ratio d'absorbance 260/280 est inférieur à 1,8 ce qui indique une contamination protéique.

Cette étude a été limitée l'absence et/ou le manque des ressources de solutions et de réactifs nécessaire pour la réalisation d'une extraction d'acides nucléiques bactériens (Trizol, Protéinase K, Lysozyme frais, réactifs nécessaire pour l'électrophorèse).

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

- Mener une étude envisagée sur une large gamme d'échantillons ;
- Etudier une population saine pour une comparaison qualitative et quantitative ;
- Caractérisation du microbiome intestinal des patients atteints de CCR par qRT PCR et séquençage de l'ARN 16S ;
- Etudier la résistance aux antibiotiques des bactéries associées aux cancers étudiés;

Bibliographie–webographie

A

- **Anthony L.** (2018). Microbiote et cancer. *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue*. 21, 33-56.
- **Amersi, F., Agustin, M., & Ko, C. Y.** (2005). Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 18(03), 133–140.
- **Aparicio, T., Mitry, E., Sa Cunha, A., & Girard, L.** (2005). Prise en charge des cancers colorectaux des sujets âgés. *Gastro entérologie Clinique et Biologique*, 29(10), 1014–1023.
- **Arnold M., Sierra M.S., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F.** (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Intestin*. 66:683-691

B

- **Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JL.**(2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*; 307: 1915-20.
- **Burns, M. B., Lynch, J., Starr, T. K., Knights, D., & Blekhman, R.** (2015). Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Medicine*, 7(1), 50-55
- **Bernalier-Donadille, A.** (2010). Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastro entérologie Clinique et Biologique*, 34, 16–22.
- **Bruneau, A., Baylatry, M.-T., Joly, A. C., & Sokol, H.** (2018). Le microbiote intestinal : quels impacts sur la carcinogénèse et le traitement du cancer colorectal ? *Bulletin Du Cancer*, 105(1), 70–80.

C

- **Chauvenet, M., Cottet, V., Lepage, C., Jooste, V., Faivre, J., & Bouvier, A.-M.** (2011). Trends in colorectal cancer incidence: a period and birth-cohort analysis in a well-defined French population. *BMC Cancer*, 11(1), 43-65

- **Chetty, R., Stepner, M., Abraham, S., Lin, S., Scuderi, B., Turner, N et al.** (2016). The Association Between Income and Life Expectancy in the United States, 2001-2014. *JAMA*, 315(16), 1750
- **Coudeyras, S., & Forestier, C.** (2010). Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(8), 611–650.

D

- **Dove WF, Clipson L, Gould KA, et al.** (1997). Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res*; 57 (5):812–4.

E

- **ESMO.**(2012). Stomach cancer: a guide for patients. *Anti cancer Fund.* 1, 3-10

F

- **Feng, Q., Liang, S., Jia, H., Stadlmayr, A., Tang, L., Lan, Z., et al.**(2015). Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. *Nature Communications*, 6(1).
- **Feng, R.-M., Zong, Y.-N., Cao, S.-M., & Xu, R.-H.** (2019). Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? *Cancer Communications*, 39(1) :22.
- **Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F.** (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386
- **Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, et al.,** (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
- **Ferrara, N.** (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*, 2(10), 795–803

G

- **Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Cerf-Bensussan, N.** (2009). The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity*, 31(4), 677–689.

- **Gérard, P., & Bernalier-Donadille, A.** (2007). Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 28–36.
- **Gupta, B., & Kumar, N.** (2017). Worldwide incidence, mortality and time trends for cancer of the oesophagus. *European Journal of Cancer Prevention*, 26(2), 107–118.

H

- **Hooper, L.** (2004). Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology*, 12(3), 129–134.

i

- **INSERM**, Microbiote intestinal (flore intestinale) Une piste sérieuse pour comprendre l'origine de nombreuses maladies. Microbiote intestinal © PixScience pour l'Inserm.

J

- **Jiang, Z., Wang, J., Shen, Z., Zhang, Z., Wang, S.** (2021). Characterization of Esophageal Microbiota in Patients With Esophagitis and Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 11, 1-7.

K

- **Kaze E.** (2018). Le lien entre le microbiote intestinal et le cancer colorectal. Thèse de Doctorat, Université de Lille. *Faculté de pharmacie, Lille*, 94p.

L

- **Landman, C., & Quévrain, E.** (2016). Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne*, 37(6), 418–423.
- **Lichtenstein, A. H.** (1990). Intestinal Cholesterol Metabolism. *Annals of Medicine*, 22(1), 49–52.
- **Lopetuso, L. R., Severgnini, M., Ianiro, G., Pecere, S., Boškoski, I., Quaranta, G., Cammarota, G.** (2019). OC.11.4 CHARACTERIZATION OF ESOPHAGEAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH BARRETT'S ESOPHAGUS AND ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA. *Digestive and Liver Disease*, 51(04): S109

- **Liu, C., Zhang, Y., Shang, Y., Wu, B., Yang, E., Luo, Y., & Li, X.** (2018). Intestinal bacteria detected in cancer and adjacent tissue from patients with colorectal cancer. *Oncology Letters*, 17, 1115-1127.

M

- **Macfarlane, G. T., & Gibson, G.** (1994). Metabolic Activities of the Normal Colonic Flora. *Springer Series in Applied Biology*, 17–52.
- **Macpherson, A. J., & Harris, N. L.** (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 478–485.

N

- **Nau, J.** (2011). Qu'est-ce donc qu'un microbiote intestinal normal ?. *Rev Med Suisse*, 301(3), 1434-1435.

O

- **Organisation mondiale de la santé** . Statistiques sanitaires mondiales 2020 : Suivi de la santé au service des ODD, Objectifs de développement durable. Organisation mondiale de la santé; Genève, Suisse: 2020.
- **Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M., & Belzer, C.** (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 2(104), 1-11.

P

- **Perez, P. F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Donnet-Hughes, A.** (2007). Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *PEDIATRICS*, 119(3), 724–732.
- **Plummer, J., Chin, S., Aronson, M., Graham, R., Williams, N., Bapat, B., Gallinger, S.** (2012). Lynch syndrome in a predominantly Afrocentric population: a clinic pathological and genetic study. *Canadian Journal of Surgery*, 55(5), 294–300.

R

- **Ridlon, J. M., Kang, D.-J., & Hylemon, P.** (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 241–259.

- **Rigottier-Gois, L., Bourhis, A.-G., Gramet, G., et al.**(2003). Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(2), 237–245.

S

- **Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E.** (2021). Un examen du cancer colorectal en termes d'épidémiologie, de facteurs de risque, de développement, de symptômes et de diagnostic. *Cancers*, 13(9), 2025.
- **Seksik, P.** (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52(2), 237–242.
- **Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, Garrett, W. S.** (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573.
- **Strakova, N., Korena, K., & Karpiskova, R.** (2021). Klebsiella pneumoniae producing bacterial toxin colibactine as a risk of colorectal cancer development – A systematic review. *Toxicon*, 197, 126-135.

T

- **Touati, A., Talbi, M., Mairi, A., Adjebli, A., Louardiane, M., & Lavinge, J. P.** (2020). Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase and Carbapenemase-Producing Enterobacteriales Strains in Patients with Colorectal Cancer in the Oncology Unit of Amizour Hospital, Algeria: A Prospective Cohort Study. *Microbial Drug Resistance*, 26(11), 1383-1389.
- **Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J. R., & Dutilh, B. E.** (2012). A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 575–582.

U

- **Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, and R. J. Schlemper.** (2001). Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* 345:784-789.

W

- **Wei. Z, Cao. S, Liu. S, Yao. Z, Sun. T, et al.**(2016). Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget*, 7(29):46158–72.
- **Wong, M. C., Huang, J., Lok, V., Wang, J., Fung, F., Ding, H., &Zheng, Z.-J.** (2020). Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer, Worldwide, Based on Sex, Age, and Anatomic Location. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. (5):955-966.
- **Wroblewski L, R Peek, Jr. et K Wilson** (2010), *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *ClinMicrobiol Rev*23:713-739.

y

- **Yu, J., Feng, Q., Wong, S. H., Zhang, D., Liang, Q. yi, Qin, Y., et al.**(2015). Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*, 66(1), 70–78

Sites web:

- <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2011/revue-medicale-suisse-301/qu-est-ce-donc-qu-un-microbiote-intestinal-normal> (consulté le 28/03/2022).
- <https://docplayer.fr/18293140-Le-microbiote-intestinal-humain.html> (consulté le 27/03/2022)
- <https://www.theragora.fr/DP-microbiote-la-revol-INRA-1217> (consulté le 27/03/2022)
- <https://www.chu-nantes.fr/cancers-digestifs-gastriques-et-hepatiques> (consulté le 11/04/2022)
- <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/colorectal/risks> (consulté le 11/04/2022)
- <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Traitements> (consulté le 13/04/2022).
- https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/what-is-colorectal-cancer.htm (consulté le 15/04/2022).
- <https://www.planetesante.ch/Magazine/Cancer/Cancer-de-l-estomac/Rare-en-Suisse-le-cancer-de-l-estomac-est-souvent-fatal> (consulté le 07/07/2022)

Annexe I

Fiche d'exploitation, Page 1/2

Fiche d'exploitation

Nom :.....
 Prénom :.....
 Age :
 Poids :
 Date de naissance :.... /.... /....
 Lieux de résidence :.....

A) Alimentions et mode de vie :

1) Nombre et type de repas par journée :

Petit-déjeuner :

Déjeuner :

La collation (l'après-midi) :

Diner :

Eau (L/jour) :

Autres :

2) Produits laitiers (*Lben*, yaourt, fromages...)?

.....

3) Produits carnés ?

.....

4) Consommation d'alcool : Oui Non 5) Fumeur : Oui Non 6) Tabac a chéquier : Oui Non 7) Comportement sédentaire ? Oui Non

.....

8) Activités physiques ? (Marche, Sport ... etc.)

.....

B) Santé et antécédents médicaux :1) Membre de la famille avec la même maladie (CCR) ? Oui Non

2) autre cancer :

Fiche d'exploitation, Page 2/2

3) Diabète : **Oui** **Non**

4) HTA : **Oui** **Non**

5) Anémie : **Oui** **Non**

6) Autre :

7) Siege de cancer :

Colon D Colon G colon transverse Rectum sigmoïde

8) **Diarrhée** : Souvent Parfois Rarement

9) **Constipation** : Souvent Parfois Rarement

10) **Douleur abdominal** : Souvent Parfois Rarement

11) A quel moment de la journée avez-vous « Moins » mal ?

•Matin •Midi •Après-midi •Le soir •imprévisible

12) A quel moment de la journée avez-vous « PLUS » mal ?

•Matin •Midi •Après-midi •Le soir •imprévisible

12) Antibiotiques : OUI NON Type d'ATB :

13) Autres Traitement particulier ? Oui Non

Type :

.....

.....

15) Opération chirurgical ? Oui Non

Type :

.....

.....

.....

Annexe II

Réactifs, matériels (verrerie) et Appareillage utilisés

Solution et réactifs :

Eau distillée, eau physiologique ; chloroforme ; Ethanol ; alcool ; violet de gentiane ; fushine ; lugol ; Tris-Hcl ; Lysozyme ; glycérol ;

Matériels (verrerie) et Appareillage :

Embouts ; tubes Eppendorf ; colonne d'extraction ; lames et lamelles ; Flacon en verre, Biotex de coproculture ; boites de pétri ; tube à essai en verre ; micropipettes ; Erlenmeyer ; éprouvette ; anse de platine ; pipette pasteur ; tube porteur ; spatule ; verres de montre ; bec bunsen ; étuve réglée à 37° C ; réfrigérateur réglé à 4 °C ; congélateur réglé à -20°C ; balance ; plaque chauffante agitatrice ; centrifugeuse ; vortex ; autoclave ; microscope optique ; ThermoMixer ; spectrophotomètre automatisé (BioDrop) ;

Annexe III

Composition et intérêt des milieux de culture utilisés.

Milieux de culture	Composition	Intérêt
Gélose Columbia au sang cuit (chocolat)	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.
Gélose Columbia au sang frais	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
Gélose Mc Conkey	Digestion pancréatique de la Gélatine : 17.0 g/l Lactose monohydraté : 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
Gélose EMB	Peptone bactériologique : 10.0 g/l Lactose : 5.0 g/l Saccharose : 5.0 g/l Phosphate dipotassique : 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
Gélose nutritive	Peptone de gélatine : 5.0 g/l Extrait de boeuf: 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
Gélose Chapman	D-mannitol 10g/l Chlorure de sodium 75g/l Digestion peptique de tissu animal 5g/l Digestion pancréatique de caséine 5g/l Extrait de boeuf 1g/l Rouge de phénol 0.025g/l Agar 15g/l	Milieu sélectif permettant la croissance des germes halophiles et de rares bactéries Gram négatives.

	Ph 7.4 ± 0.2	
Gélose PCA	Tryptone : 5.0g/l Extrait de levure : 2.5 g/l Glucose : 1.0g/l Agar agar bactériologique : 12g/l Ph : 7.0 ±0.2	Milieu non sélectif et riche en nutriment permettant la culture des germes non exigeant et le dénombrement des bactéries aérobie dans l'eau, les produits laitiers, et les produit pharmaceutique
Gelose BEA	Extrait de bœuf : 11g/l Digestion enzymatique de gélatine :34.5g/l Esculine : 1.0g/l Sulfate de manganèse : 0.05g/l Bile de bœuf : 2.0g/l Citrate d'ammonium ferrique : 0.5g/l Gélose : 15.0g/l Ph : 7,1	Milieu différentiel et sélectif permet la croissance des <i>Enterococcus</i> et <i>Streptococcus</i> de groupe D
Bouillant nutritive	Peptones ; 10g/l Extrait de bœuf : 1.0g/l Extrait de levure : 2.0g/l Chlorure de sodium : 5.g/l Ph :6.8 ±0.2	Milieu utilisé pour la culture du micro-organisme peu exigeant

Annexe IV
 Galerie API 20E *Klebsiella pneumoniae*



Annexe V

Les différentes formes de colonies obtenues sur les différents milieux.

A/ Sur gélose nutritive :



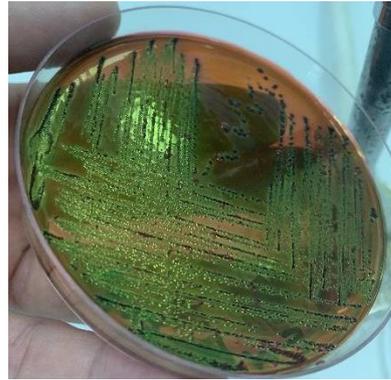
B/ Sur PCA :



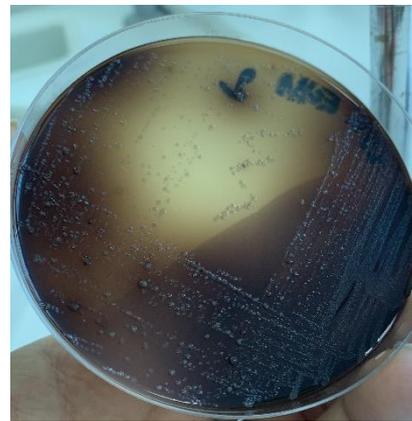
C/ Sur gélose Mc Conkey



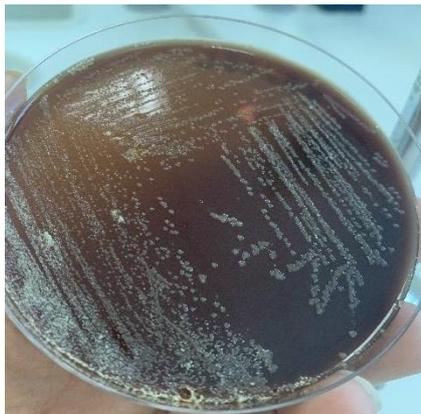
D/ Sur gélose EMB :



E/ Sur gélose BEA :



F/ Sur gélose au sang cuit :



Résumé

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus fréquents au niveau mondial, son incidence ne cesse d'augmenter ces dernières années. De nombreuses études ont démontré le concept selon lequel le microbiome intestinal serait un facteur environnemental majeur pouvant moduler le risque de cancer colorectal. Les données et les échantillons de la matière fécale des patients atteints du cancer colorectal ont été récoltés au niveau d'EPH d'Amizour (service d'oncologie). L'analyse microbiologique et moléculaire a été réalisée dans le laboratoire Génie Biologique des Cancers de la Faculté Médecine de l'Université de Bejaia. L'ensemble des données ont montrés que les patients âgés entre 50 à 70 ans sont les plus touchés par le Cancer Colorectal. Les catégories d'âges de [30- 40] et [40- 50] ont été les moins touchés par ce type de Cancer. Le sexe masculin a été le plus exposé au risque de contracté un cancer colorectal que le sexe féminin. Le cancer de sigmoïde, cancer de rectum, cancer colon transverse et le cancer du colon ascendant ont été les cancers les plus enregistrés parmi la population étudiée. Le facteur héréditaire est plus dominant par rapport aux autres facteurs de risque. Les résultats obtenus ont montré des faibles pics d'absorption à 260-280 nm avec les trois protocoles d'extraction (Trizol/lysozyme, QiAmp RNA Viral et Kit QiAmp/lysozyme). Un ratio 260/280 a été inférieur à 1,8 ce qui indique une contamination protéique. L'identification bactérienne a révéle la présence de certaine genres bactériens pathogènes et opportunistes tel que *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Shigella sp* et *Streptococcus* de groupe D. Ces résultats nous permettent de conclure qu'une dysbiose de microbiome intestinal chez les patients cancer colorectaux d'EPH d'Amizour est fortement présent.

Mots clés : Microbiome, Cancer Colorectal, Extraction, Identification.

Abstract

Colorectal cancer is one of the most common cancers worldwide and its incidence has been increasing in recent years. Numerous studies have demonstrated the concept that the gut microbiome is a major environmental factor that can modulate the risk of colorectal cancer. Data and samples of fecal matter from colorectal cancer patients were collected at the EPH of Amizour (oncology department). The microbiological and molecular analysis was performed in the laboratory of Biological Engineering of Cancers of the Faculty of Medicine of the University of Bejaia. All the data showed that patients aged between 50 and 70 years are the most affected by colorectal cancer. The age categories [30-40] and [40-50] were the least affected by this type of cancer. The male sex was more exposed to the risk of contracting colorectal cancer than the female sex. Sigmoid cancer, rectal cancer, transverse colon cancer and ascending colon cancer were the most registered cancers among the studied population. The hereditary factor was more dominant than the other risk factors. The results obtained showed weak absorption peaks at 260-280 nm with all three extraction protocols (Trizol/lysozyme, QiAmp RNA Viral and QiAmp/lysozyme Kit). A 260/280 ratio was less than 1.8 indicating protein contamination. Bacterial identification revealed the presence of certain pathogenic and opportunistic bacterial genera such as *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Shigella sp* and *Streptococcus* group D. These results allow us to conclude that a dysbiosis of intestinal microbiome in colorectal cancer patients of EPH of Amizour is strongly present.

Key words: Microbiome, Colorectal cancer, Extraction, Identification