

Democratic and Popular Republic of Algeria  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministry of Higher Education and Scientific Research  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Higher National Veterinary School. Rabie Bouchama  
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة  
École Nationale Supérieure Vétérinaire. Rabie Bouchama

N° d'ordre : 014

**Domaine:** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière:** Sciences vétérinaires

## Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Docteur Vétérinaire

### THÈME

Étude comparative de la flore commensale digestive et mammaire  
chez les carnivores domestiques sains et ceux atteints de tumeurs  
mammaires

**Présenté par :**

Mlle BENZEID Narimene

Soutenu, le 04 juillet 2024, devant le jury :

Mme. TENNAH.S

Professeur (ENSV)

Présidente

Mme. BOUABDALLAH.R

Maître de conférences A (ENSV)

Examinatrice

Mme. AZZAG.N

Professeur (ENSV)

Promotrice

**Année universitaire 2023-2024**



N° d'ordre : 014

**Domaine:** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière:** Sciences vétérinaires

# Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Docteur Vétérinaire

## THÈME

Étude comparative de la flore commensale digestive et mammaire  
chez les carnivores domestiques sains et ceux atteints de tumeurs  
mammaires

**Présenté par :**

Mlle BENZEID Narimene

Soutenu, le 04 juillet 2024, devant le jury :

Mme. TENNAH.S

Professeur (ENSV)

Présidente

Mme. BOUABDALLAH.R

Maître de conférences A (ENSV)

Examinatrice

Mme. AZZAG.N

Professeur (ENSV)

Promotrice

**Année universitaire 2023-2024**

## Déclaration sur l'honneur

Je soussignée l'étudiante BENZEID Narimene , déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteurs ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Narimene Benzeid', written in a cursive style.

## REMERCIEMENTS

Avant tout nous devons remercier Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la force afin de mener à bien ce travail.

Il m'est agréable de réserver ces quelques lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui nous ont apporté leur aide et leur compréhension et ont contribué, de près ou de loin, à réaliser ce travail.

En tout premier lieu, je tiens à remercier mon encadrante, **Mme AZZAG.N** qui m'a fait bénéficier de ses précieux conseils, de sa patience et de son encouragement tout au long du projet.

Je remercie également **Mme Siham** technicienne du laboratoire microbiologie médicale

Mes vifs remerciements aux membres du jury **Mme. TENNAH** et **Mme. BOUABDALLAH** pour l'intérêt qu'elles ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Sans oublier, tous mes professeurs et enseignants de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire qui ont contribué à ma formation.

Finalement, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma famille qui m'a toujours soutenu et à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de ce mémoire.

## DÉDICACES

*Je tiens à dédier ce travail à ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*Je dédie particulièrement ce travail :*

### ***À toi ma très douce maman***

*Celle qui m'a donnée la vie une fois et l'a sauvée un milliard d'autres. Tu as été ma lumière quand tout autour était sombre et quand mon avenir était un flou total. Ta gentillesse, ta force et ta persévérance m'ont toujours inspiré. Tu n'as jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs. Ta présence à mes côtés m'a toujours permis d'affronter les différents obstacles.*

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai trouver les bons mots pour te remercier convenablement.*

### ***À mon cher papa***

*La vie ne t'a pas fait de cadeaux mais ta détermination à affronter cette vie m'a toujours motivé, tu as consenti énormément de sacrifice à notre égard . Que ce travail traduit ma gratitude.*

*Merci et mille mercis maman et papa,*

*Je vous aime et vous souhaite une très longue vie avec une santé éternelle.*

***À ma sœur adoré Houda et mon cher frère Walid , mes bijoux les plus chers,***

*Avec qui les chamailles ne se terminent jamais. Que Dieu vous garde, vous bénisse, vous protège et vous offre une vie pleine de joie et de réussite.*

*À Ryad pour sa patiente et son soutien*

*Je vous aime.*

*À tous mes amis et collègues avec qui j'ai passé de très agréables moments.*

*À tous ceux qui m'aiment .*

# Résumé

La présence d'un microbiote commensal diversifié est cruciale pour la santé des carnivores domestiques, jouant le rôle de barrière protectrice et régulateur vital. Notre étude a porté sur l'analyse comparative de la flore commensale orale, digestive et mammaire chez les carnivores domestiques sains et ceux atteints de tumeurs mammaires, afin de révéler une éventuelle association significative entre les déséquilibres du microbiome et le développement du cancer mammaire. Les résultats obtenus sur 14 échantillons ont pu mettre en évidence une hétérogénéité qualitative et quantitative des genres bactériens aérobique et anaérobique du microbiote commensal. Ces résultats pourraient mieux orienter la compréhension de la pathogenèse des tumeurs mammaires, ouvrant la voie à de futures perspectives thérapeutiques.

**Mots clés :** Microbiote commensal, Tumeurs mammaires, Carnivores domestiques (chien, chat)

## Abstract

A healthy and diverse commensal microbiota is crucial to the health of domestic carnivores, playing a vital protective and regulatory role. Our comparative study investigates the oral, digestive and mammary commensal flora in healthy domestic carnivores and those with mammary tumors, to reveal a possible significant association between microbiome imbalances and mammary cancer development. The results from 14 samples revealed qualitative and quantitative heterogeneity in the aerobic and anaerobic bacterial genera of the commensal microbiota. These results could provide a better understanding of the pathogenesis of breast tumors, setting the stage for future therapeutic prospects.

**Key words:** Commensal microbiota, Mammary tumor, Domestic carnivores (dog, cat).

## ملخص

يُعتبر وجود جراثيم متجانسة متنوعة أمرًا بالغ الأهمية لصحة الحيوانات الأليفة المنزلية، حيث تعمل كحاجز وقائي ومنظم حيوي. تهدف دراستنا إلى مقارنة الفلور المتعايشة في الفم والجهاز الهضمي والثدي لدى الكلاب والقطط السليمة وتلك المصابة بالأورام الثديية، لمحاولة اكتشاف علاقة بين اختلالات الميكروبيوم وتطور سرطان الثدي. كشفت النتائج المتحصل عليها من 14 عينة عن عدم التجانس النوعي والكمي في الأجناس البكتيرية الهوائية واللاهوائية للميكروبات المتعايشة. حيث تشير هذه النتائج إلى إمكانية توفير تحليل أفضل لفهم التسبب في الإصابة بالأورام الثديية، مما يمهد الطريق لأفاق علاجية مستقبلية.

**الكلمات المفتاحية:** الميكروبات المتعايشة، أورام الثدي، حيوانات أليفة (كلب، قط)

# Table des matières

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
PREMIÈRE PARTIE : La flore bactérienne commensale.....	15
I. La flore bactérienne aérobie .....	15
II. La flore bactérienne anaérobie.....	16
III. La flore bactérienne orale .....	16
IV. La flore bactérienne intestinale.....	18
V. La flore bactérienne mammaire .....	19
DEUXIÈME PARTIE : Les tumeurs mammaires .....	21
I. Rappel anatomique et histologique de la glande mammaire .....	21
II. Généralités sur les tumeurs .....	21
III. Les différents types de tumeurs mammaires.....	22
TROISIÈME PARTIE : Déséquilibre bactérien dans les tumeurs mammaires.....	24
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	26
I. Objectif.....	26
II. Matériel.....	26
II.1. Appareillage : .....	26
II.2. Fiche d'enquête .....	27
II.3. Nature des prélèvements .....	27
III. Méthodes.....	28
III.1. Pré-Enrichissement : .....	28
III.2. Isolement et mise en culture des bactéries :.....	29
III.2.1. Méthode d'ensemencement :.....	29
III.2.2. Culture bactérienne.....	30
III.3. Identification.....	39
III.3.1. Macroscopique .....	39
III.3.2. Microscopique : Coloration de Gram.....	40
III.4. Caractérisation biochimique .....	41

III.4.1.	Les bactéries aérobies.....	41
III.4.2.	Les bactéries anaérobies.....	42
III.5.	Dénombrement des bactéries anaérobies.....	44
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....		47
I.	Recueil des commémoratifs.....	47
I.1.	Pour les animaux sains.....	47
I.2.	Pour les animaux atteints de tumeur : .....	48
II.	Analyses microbiologiques.....	49
II.1.	Cultures bactériennes.....	49
II.1.1.	En aérobiose.....	49
II.1.2.	En anaérobiose.....	54
II.2.	Caractéristique biochimique.....	57
II.2.1.	Pour les bactéries aérobies :.....	57
II.2.1.	Pour les bactéries anaérobies :.....	58
II.3.	Identification bactérienne.....	62
II.4.	Dénombrement.....	63
CONCLUSION GENERALE.....		65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		66

## Table des figures

Figure 1 Réalisation des prélèvements sur une chienne .....	28
Figure 2 Pré-Enrichissement des prélèvements sur bouillon BHIB .....	29
Figure 3 Méthode d'ensemencement par cadrans (Bensakhria A., 2018) .....	30
Figure 4 Culture bactérienne sur gélose EMB .....	31
Figure 5 Culture bactérienne sur gélose Salmonella-shigella .....	32
Figure 6 Culture bactérienne sur gélose de MacConkey .....	34
Figure 7 Croissance de Staphylococcus sur gélose Chapman .....	35
Figure 8 Gélose au sang frais .....	35
Figure 9 Prélèvements sanguins des ovins de la ferme de l'ENSV pour la réalisation de la gélose au sang frais .....	36
Figure 10 Jarre d'anaérobiose.....	37
Figure 11 Bactéries anaérobies sur gélose ISA avec présence de colonie sulfite-réductase .....	39
Figure 12 Schéma représentatif de la coloration de Gram.....	41
Figure 13 Galerie API 20E de l'échantillon S04 .....	42
Figure 14 Test de catalase + : présence d'effervescence .....	43
Figure 15 Résultats du test urée indole .....	44
Figure 16 Dénombrement bactérien sur gélose ISA .....	45
Figure 17 Interprétation de caractère biochimique sur API 20E .....	58

## Liste des Tableaux

Tableau 1 Bactéries commensales de la cavité buccale .....	18
Tableau 2 Bactéries commensales de la flore intestinale.....	19
Tableau 3 Bactéries commensales de la flore mammaire .....	20
Tableau 4 Récapitulatifs des tumeurs mammaires.....	23
Tableau 5 Recueil commémoratif des animaux sains .....	47
Tableau 6 Recueil commémoratif des animaux atteints de tumeurs.....	48
Tableau 7 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en aérobiose pour ls prélèvement oral .....	50
Tableau 8 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en aérobiose pour le prélèvement mammaire.....	51
Tableau 9 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en aérobiose pour le prélèvement intestinal.....	53
Tableau 10 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en anaérobiose pour le prélèvement oral.....	54
Tableau 11 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en anaérobiose pour le prélèvement mammaire.....	55
Tableau 12 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en anaérobiose pour le prélèvement intestinal .....	56
<i>Tableau 13 Représentent les tests biochimiques Urée indole et catalase sur la flore orale .....</i>	<i>59</i>
Tableau 14 Représentent les tests biochimiques Urée indole et catalase sur la flore mammaire .....	60
Tableau 15 Représentent les tests biochimiques Urée indole et catalase sur flore intestinale.....	61
Tableau 16 Identification des principales espèces isolées à partir des prélèvements buccaux, mammaires et intestinaux.....	62
Tableau 17 Dénombrement sur gélose ISA de la flore anéorobie .....	63

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Chez tous les êtres vivants, la présence de microorganismes colonisant de manière permanente et non pathogène différentes surfaces de l'organisme, telles que le tractus digestif, les voies respiratoires ou la peau, est désignée sous le terme de « microbiote commensal ». Cet écosystème complexe, unique à chaque individu, joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie et de la santé de l'hôte.

En effet, les bactéries, virus, champignons et archées qui composent le microbiote commensal assurent de multiples fonctions bénéfiques pour l'organisme. Ils permettent notamment de limiter la prolifération de pathogènes, de stimuler le développement et la maturation du système immunitaire, ou encore de participer à la digestion et à l'absorption des nutriments.

Cependant, l'équilibre de cet écosystème microbien peut être perturbé par divers facteurs environnementaux et physiologiques, tels que l'administration d'antibiotiques, les changements alimentaires, le stress ou encore certaines maladies. Ces déséquilibres, appelés dysbioses, sont susceptibles d'avoir des conséquences délétères sur la santé et le bien-être des animaux de compagnie. (Suchodolski., 2016).

Existe-il une association directe ou indirecte entre microbiome et développement du cancer au niveau de la mamelle chez les carnivores domestiques ? Est-ce qu'un phénomène de dysbiose apparaît lors d'une tumeur mammaire ? Ce travail a pour ambition de fournir des réponses à ces questions aux vétérinaires, cliniciens et microbiologistes.

Ce mémoire aura donc pour objectif d'étudier la composante de la flore commensale mammaire, orale et intestinale chez les carnivores domestiques sains et atteint de tumeurs. Ensuite d'identifier les espèces bactériennes dominantes pour chaque région.

La présente étude est structurée et sera exposée dans ce mémoire en trois chapitres distincts :

Le premier chapitre est dédié à l'étude bibliographique. Le deuxième chapitre aborde l'étude expérimentale réalisée sur des carnivores domestiques sains et d'autres souffrant de tumeurs dans la région d'Alger. Le troisième chapitre présente les résultats de l'étude, suivis d'une discussion et d'une analyse critique. En conclusion, le document propose des perspectives futures ainsi que des recommandations découlant de l'étude.

**CHAPITRES I :**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### PREMIERE PARTIE : La flore bactérienne commensale

Comme tout être vivant, l'animal abrite en lui des « microbiotes », un ensemble de micro-organismes peuplant différentes parties anatomiques. Cet écosystème, appelé microbiome est crucial pour la santé de l'hôte. Son équilibre repose sur une série d'interactions complexes, synergiques et antagonistes entre les micro-organismes d'une part, et entre les micro-organismes et leur hôte d'autre part. (WALKER R.J., 2004).

Le microbiote contient des milliers de bactéries qui vivent en parfaite symbiose avec l'hôte. Appelées « bactéries commensales », ces dernières sont habituellement inoffensives, elles jouent un rôle majeur contre les bactéries pathogènes en adoptant essentiellement deux mécanismes : la compétition pour certains nutriments ou certains sites d'adhésions, et l'inhibition en produisant des substances antimicrobiennes qui empêchent le développement de micro-organismes exogènes (Wyllie & Spéjel, 2020).

La flore commensale bactérienne peut être définie comme l'ensemble des bactéries qui colonisent de façon non pathogène diverses surfaces du corps humain, telles que la peau, les muqueuses ou le tube digestif (Sekirov et al. 2010).

De plus, les bactéries commensales jouent un rôle dans le développement et la modulation du système immunitaire de l'organisme. Elles permettent la maturation du système immunitaire lors des premiers stades de la vie, régulant ainsi positivement les réponses inflammatoires en évitant les réactions excessives face aux agents non pathogènes (Belkaid & Hand, 2014).

En interagissant étroitement avec les cellules de l'hôte, cette flore participe également aux fonctions métaboliques de l'hôte et à la décomposition des aliments en nutriments. (Round & Mazmanian, 2009). Elle joue donc un rôle important dans la santé générale des individus.

Nous nous limitons dans cette première partie du chapitre aux bactéries commensales les plus fréquentes au niveau buccal, intestinal (anal) et cutané (mammaire) chez le chat et le chien.

#### I. La flore bactérienne aérobie

Parmi les principales zones colonisées par ces micro-organismes chez les chiens et chats, nous retrouvons l'intestin, la bouche, la peau et les glandes mammaires chez les femelles. Chaque type de flore a des fonctions spécifiques :

- La flore intestinale, majoritairement présente dans le côlon, est composée notamment de *Bacillota* principalement les *Entérobactéries* et *Protéobactéries* telle que les *Lactobacilles*. Cette flore joue

un rôle clé dans la maturation du système immunitaire, la digestion et la production de vitamines (Suchodolski et al., 2012).

- La flore buccale, composée entre autres de *Streptococcus*, *Actinomyces* et *Lactobacillus*, participe à la digestion et empêche la colonisation des bactéries pathogènes (Dewhirst et al. 2010).
- La flore cutanée, avec des coccoides (*Staphylococcus*, *Micrococcus*) et de bacilles (*Corynebacterium*), constitue une barrière contre les infections cutanées (Griffiths et al. 2013).
- La flore mammaire, importante chez la femelle, composée de *staphylocoques* à coagulase négative, joue un rôle dans la défense de la glande mammaire (Ziesemer et al. 2019).

## II. La flore bactérienne anaérobie

La flore anaérobie observée chez le chien et le chat présente des similitudes avec celle retrouvée chez l'Homme dans les mêmes sites. Ce microbiote complexe contribue à l'équilibre de l'organisme hôte.

- Dans la cavité buccale, les anaérobies commensaux les plus communs d'après la littérature scientifique sont *Porphyromonas spp.* (Zaura et al. 2009) et *Fusobacterium nucleatum* (Dewhirst et al. 2010)
- Au niveau intestinal, on retrouve couramment des bactéries appartenant aux genres *Clostridium* comme *C. leptum* et *C. coccoides* (Handl et al. 2013), *Bacteroides spp.* (Swanson et al. 2002) et *Prevotella spp.* (Tannock, 2005). Ces microorganismes jouent un rôle important dans le métabolisme de l'hôte et l'équilibre de son microbiote digestif.
- Pour la flore de la glande mammaire, les espèces anaérobies commensales les plus fréquemment isolées sont *Peptoniphilus spp* et *Fingoldia magna* (Gonzalez et al. 1993). Ces bactéries colonisent de façon naturelle la muqueuse mammaire chez les chiens et les chats sains.

Ainsi, des études mettent en évidence la prédominance habituelle de certains genres bactériens anaérobies comme *Clostridium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Peptoniphilus* et *Fusobacterium* au sein de ces principaux écosystèmes du chien et du chat en tant que microbiote résident commensal.

## III. La flore bactérienne orale

La cavité buccale des carnivores domestiques héberge une flore bactérienne dense et diversifiée. (Kennedy et al. 2020). Comme chez l'humain, on distingue au sein de cette microflore buccale canine et féline de nombreuses bactéries aérobies et anaérobies facultatives.

Parmi les principaux genres bactériens aérobies décrits, on retrouve fréquemment les streptocoques du complexe *mitis* tels que *Streptococcus oralis* et *S.mitis* (Simpson et al. 2018). D'autres Cocci à Gram positif comme *Staphylococcus pseudintermedius* et *Stomatococcus mucilaginosus* sont également prédominants dans la cavité buccale des carnivores (Zhang et al. 2019).

Des bacilles aérobies comme *Actinomyces viscosus*, *Pasteurella multocida* ou encore *Eikenella corrodens* ont aussi été isolés en association étroite avec ces streptocoques et staphylocoques (Thompson et al. 2017). La composition relative de ces flores bactériennes aérobies semble dépendre de facteurs individuels comme l'âge, l'alimentation ou la santé bucco-dentaire de l'hôte (Lima et al. 2015).

Une meilleure caractérisation de cette microflore buccale aérobie revêt donc un intérêt certain pour la gestion de la santé orale des carnivores domestiques.

La cavité buccale héberge une diversité considérable de micro-organismes qui sont constamment en contact avec leur environnement et se révèlent vulnérables aux effets extérieurs. (Dimmitt et al. 2017)

Il existe un équilibre symbiotique entre les différents micro-organismes présents dans la cavité buccale, fondé sur des bénéfices réciproques. La flore commensale ne provoque aucun dommage et contrôle les souches potentiellement pathogènes en les empêchant d'adhérer à la muqueuse. Les bactéries ne deviennent pathogènes que lorsqu'elles parviennent à dépasser la barrière protectrice formée par les espèces commensales, ce qui peut alors provoquer une infection ou une maladie. Grâce à leur cohabitation pacifique reposant sur des interrelations positives, les populations microbiennes buccales s'autorégulent naturellement dans cet environnement confiné. (M Avila, DM Ojcius, Ö Yilmaz., 2009).

Le tableau 01 regroupe les principales bactéries aérobies et anaérobies présents dans la cavité buccale saine des carnivores domestiques.

Tableau 1 Bactéries commensales de la cavité buccale

	Gram Positif		Gram Négatif	
Aérobies	<i>Streptococcus</i> (Dewhirst et al., 2010).	<i>S. mitis</i>	<i>Neisseria</i> (Enersen et al. 2006).	<i>N. flavescens</i>
		<i>S. oralis</i>		<i>N. subflava</i>
		<i>S. sanguinis</i>		<i>N. flava</i>
	<i>Actinomyces</i> (Aas et al. 2005).	<i>A. naeslundii</i>	<i>Veillonella</i> (Kawamura et al. 1995).	<i>N. sicca</i>
		<i>A. oris</i>		<i>V. atypica</i>
	<i>Rothia</i> (Kawamura et al. 1995).	<i>R. dentocariosa</i>		<i>V. dispar</i>
<i>R. mucilaginosa</i>		<i>V. parvula</i>		
<i>R. terrae</i>		<i>Haemophilus</i> (Dewhirst et al. 2010).	<i>H. parainfluenzae</i>	
Anaérobies	/		<i>Fusobacterium</i> (Kostic et al. 2013).	<i>F. nucleatum</i>
				<i>F. necrophorum</i>
			<i>Porphyromonas</i> (Zhang et al. 2017).	<i>P. circumdentaria</i>
				<i>P. crevioricanis</i>
			<i>Prevotella</i> (Lima et al. 2015).	<i>P. nigrescens</i>
				<i>P. intermedia</i>
			<i>Bacteroides</i> (Dewhirst et al. 2012).	<i>B. salyersiae</i>
				<i>B. vulgatus</i>
			<i>Veillonella</i> (Boutaga et al. 2007).	<i>V. parvula</i>
<i>V. atypica</i>				

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

#### IV. La flore bactérienne intestinale

La flore intestinale joue un rôle crucial dans la santé et le bien-être des carnivores domestiques. (Suchodolski et al., 2012). Cette communauté microbienne complexe, composée de plusieurs espèces bactériennes, est essentielle aux fonctions digestives et immunitaires de l'hôte (Herstad et al., 2020).

Les bactéries aérobies et anaérobies facultatives constituent une part importante de la microflore intestinale canine et féline (Guardabassi et al., 2004). Parmi elles, les genres *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* et *Bacillus* sont communément décrits comme dominants dans le microbiote intestinal des carnivores domestiques (Seo et al., 2012; Kennedy et al., 2014).

D'autres espèces bactériennes aérobies comme *Corynebacterium*, *Micrococcus* ou *Streptococcus* ont également été isolées en association étroite avec les genres prédominants (Suchodolski, 2011). L'abondance relative de ces diverses bactéries aérobies peut varier selon l'âge, l'alimentation ou l'état de santé de l'hôte carnivore (Kennedy et al., 2014).

Une bonne compréhension de la composition et de la dynamique de cette flore intestinale aérobie revêt comme pour celles décrites dans la cavité buccale une importance particulière pour la gestion de la santé digestive des chiens et des chats.

Les principales bactéries aérobies de la flore intestinale des carnivores domestiques sont présentées dans le tableau 2 :

Tableau 2 Bactéries commensales de la flore intestinale

	Gram Positif		Gram Négatif		
Aérobies	<i>Enterococcus</i> (Suchodolski et al. 2012)	<i>E. faecalis</i>	/		
		<i>E. faecium</i>			
	<i>Staphylococcus</i> (Guardabassi et al, 2004)	<i>S. pseudintermedius</i>			
		<i>S. aureus</i>			
	<i>Lactobacillus</i> (Herstad et al. 2020)	<i>L. acidophilus</i>			
		<i>L. casei</i>			
	<i>Bacillus</i> (Seo et al. 2012)	<i>B. cereus</i>			
		<i>B. subtilis</i>			
		<i>B. licheniformis</i>			
	<i>Micrococcus</i> (Kennedy et al. 2014)	<i>M. luteus</i>			
<i>M. lylae</i>					
<i>Corynebacterium</i> (Suchodolski, 2011)	<i>C. kutscheri</i>				
	<i>C. renale</i>				
Anaérobies	<i>Clostridium</i> (Suchodolski et al., 2012)	<i>C. perfringens</i>	<i>Bacteroides</i> (Herstad et al. 2020)	<i>B. vulgatus</i>	
		<i>C. difficile</i>		<i>Fusobacterium</i> (Guardabassi et al. 2004)	<i>B. uniformis</i>
					<i>F. varium</i>
	<i>C. hiranonis</i>	<i>Bilophila</i> (Teng et al. 2018)	<i>Prevotella</i> (Tanner et al. 2015)	<i>F. necrophorum</i>	
				<i>B. wadsworthia</i>	
				<i>P. copri</i>	
				<i>P. oralis</i>	
				<i>P. melaninogenica</i>	

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

### V. La flore bactérienne mammaire

La glande mammaire des chiens et chats héberge une communauté bactérienne commensale jouant un rôle important dans la protection de la mamelle. Chez le chien, *Staphylococcus pseudintermedius* fait partie du microbiote mammaire normal selon Devriese et al. (2005).

D'autres études ont identifié *Staphylococcus schleiferi*, *S. aureus* et *Enterococcus faecium/durans* comme des résidents commensaux de la mamelle canine (Rodrigues Hoffmann et al., 2014; Branda et al., 2020).

Chez le chat, *Staphylococcus felis* et *S. epidermidis* ont été décrits comme commensaux mammaires (Lamb et al., 2015). Bien que pouvant occasionnellement devenir pathogènes, ces bactéries jouent un rôle protecteur au sein de l'écosystème mammaire lorsqu'elles sont à un niveau d'abondance équilibré.

Caractériser précisément la composition et la dynamique de ces flores commensales revêt donc un intérêt pour comprendre leur implication dans le maintien de l'homéostasie mammaire ou le développement de mastites.

Les principales bactéries commensales aérobies et anaérobies de la flore mammaire des carnivores domestiques sont résumées dans le tableau 03 :

Tableau 3 Bactéries commensales de la flore mammaire

		Gram Positif	Gram Négatif	
Aérobies	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. pseudintermedius</i> (Devriese et al., 2005)	/	
		<i>S. schleiferi</i> (Rodrigues Hoffmann et al., 2014)		
		<i>S. aureus</i> (Branda et al., 2020)		
		<i>S. felis</i> (Lamb et al., 2015)		
		<i>S. epidermidis</i> (Lamb et al., 2015)		
Anaérobies	<i>Clostridium</i>	<i>C. hiranonis</i> (Suchodolski et al. 2012)	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella spp</i> (Tanner et al. 2015)
			<i>Fusobacterium</i>	<i>F. varium</i> (Guardabassi et al., 2004)
			<i>Bacteroides</i>	<i>B. vulgatus</i> (Dewhirst et al., 2012)
			<i>Veillonella</i>	<i>Veillonella spp</i> (Machado et al. 2012)

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

## **DEUXIEME PARTIE : Les tumeurs mammaires**

### **I. Rappel anatomique et histologique de la glande mammaire**

Chez les mammifères carnivores domestiques, la glande mammaire est un organe pair composé de lobes glandulaires indépendants. On distingue généralement quatre paires de mamelles abdominales, numérotées de 1 à 4 selon un axe cranio-caudal (Noble et Hendrickson, 2005).

Anatomiquement, chaque glande mammaire est composée de lobes glandulaires indépendants, eux-mêmes constitués de lobules. Le lobule contient de nombreux acini (alvéoles) producteurs de lait, reliés à un canal galactophore collecteur. Les canaux galactophores se jettent dans le mamelon (Fitschen, 2013).

Histologiquement, l'unité fonctionnelle de base de la glande mammaire est l'acinus lactifère, formé de cellules épithéliales glandulaires polarisées qui synthétisent et sécrètent le lait. On distingue les cellules basales myoépithéliales en périphérie et les cellules luminales alvéolaires au centre. La paroi des acini est entourée de tissu conjonctif et adipo-glandulaire richement vascularisé (Noble et Hendrickson, 2005; Fitschen, 2013).

En dehors des périodes de lactation, la glande mammaire reste inactive. A l'approche de la parturition, sous l'effet des œstrogènes et de la prolactine, elle subit une transformation lobulo-alvéolaire pour devenir fonctionnelle (Noble et Hendrickson, 2005).

### **II. Généralités sur les tumeurs**

Une tumeur est définie selon ROUSSY G. et al comme une prolifération anormale et excessive des cellules d'un tissu, conduisant à une surproduction persistante et croissante de ce tissu. Même si la structure du tissu tumoral peut ressembler à celle du tissu original, elle diffère biologiquement et ne suit plus les lois normales de l'organisme.

(ZOLINGER H. 1970) décrit une tumeur comme une croissance anarchique et autonome, indéfiniment progressive dérivée des propres cellules de l'organisme. ROUSSY G. et al. Ajoutent que certains processus prolifératifs anormaux résultent d'une multiplication cellulaire excessive en réaction à un stimulus anormal, tant que ce dernier persiste.

Les tumeurs mammaires, constituent environ 50% des tumeurs chez les chiennes et 10 à 30% chez les chattes, (Owen, 1980; Misdorp et Hart, 2001). Il existe une distinction entre les tumeurs bénignes, telles que les adénomes, et les tumeurs malignes invasives, comme les carcinomes. Les carcinomes forment à peu près 25% des tumeurs mammaires canines, étant en général invasifs et métastatiques

(Owen, 1980), tandis qu'ils sont moins fréquents mais plus agressifs chez les chattes (Misdorp et Hart, 2001).

L'âge est un facteur de risque pour le développement de tumeurs mammaires, avec un pic entre 7 et 11 ans chez les chiennes (Owen, 1980). Les facteurs hormonaux, tels que les cycles de chaleur répétés ou une stérilisation tardive, sont également reconnus comme des facteurs de risque (Misdorp et Hart, 2001). Par conséquent, un dépistage régulier est crucial pour un diagnostic précoce et pour améliorer le pronostic.

### **III. Les différents types de tumeurs mammaires**

Il existe deux grands types de tumeurs classés selon leur comportement biologique : les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes (Nguyen et al., 2009).

Les tumeurs bénignes ou non cancéreuses se caractérisent par une croissance lente et circonscrite (World Health Organization, 2021), elles forment des masses bien délimitées, encapsulées, sans capacité invasive ni pouvoir métastatique (Delalogue et al., 2005). Au niveau cellulaire, les cellules conservent leur différenciation et leur organisation tissulaire normale (Abdel-Fatah et al., 2007). Par conséquent, ce type de lésion peut généralement être guéri par exérèse chirurgicale sans récurrence (Porter et al., 1999).

A l'inverse, les tumeurs malignes présentent une croissance rapide, localement invasive et métastatique (Mermel et al., 2011). Au niveau cellulaire, les cellules tumorales ont acquis des altérations génétiques leur permettant d'échapper aux mécanismes de régulation de la prolifération (Salomon et al., 2010).

Le tableau 04 énonce les différents types de tumeurs mammaires chez la chienne et la chatte :

Tableau 4 Récapitulatifs des tumeurs mammaires

Tumeurs	Bénignes	Adénome		Prolifération néoplasique d'un épithélium glandulaire ou d'un parenchyme glandulaire (glande mammaire)
		Fibrome		Tumeur du tissu fibreux, riche en collagène
		Adénofibrome		Prolifération simultanée de tissu glandulaire et de tissu fibreux
		Tumeur bénigne mixte		Composée de cellules épithéliales et conjonctives (cartilage, os, tissu adipeux)
		Papillome canalaire		Excroissances glandulaires dans les canaux dilatés
	Malignes	Carcinome Non infiltrant (in situ)		Caractéristiques histologiques de malignité sans infiltration des tissus environnants
		Carcinome simple	Carcinome Tubulo-papillaire	Architecture tubulaire et/ou papillaire
			Carcinome solide	Cellules disposées en feuilles, cordes ou nids
			Carcinome anaplasique	Grandes cellules pléomorphes avec noyaux bizarres
		Carcinomes particuliers	Cribriforme	Très invasive, avec des cavités criblées
			Spinocellulaire	Cellules organisées en feuillets et cordons compacts avec différenciation squameuse
		Carcinosarcome		Cellules épithéliales et mésenchymateuses
	Sarcomes		Grande taille, ferme à osseuse (fibrosarcomes, ostéosarcome)	

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

**TROISIEME PARTIE : Déséquilibre bactérien dans les tumeurs mammaires**

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'hôte, un déséquilibre dans la composition ou la fonction du microbiote (dysbiose) est associée à diverses pathologies comme les cancers (Yu et Zhao, 2018).

Plusieurs études sur le cancer du sein suggèrent, que la dysbiose intestinale pourrait favoriser l'initiation et la progression tumorale via différents mécanismes, en entraînant une augmentation de la production de métabolites pro-inflammatoires dérivés des bactéries comme les amines, l'azote et les acides gras à chaînes courtes qui activent les voies de signalisation pro-tumorales NF- $\kappa$ B et STAT-3 (Durrani et al., 2020). De plus, les bactéries pathobiontes opportunistes proliférant dans un intestin dysbiotique sécrètent des toxines génotoxiques ou induisent un stress oxydatif qui endommagent l'ADN des cellules de la muqueuse intestinale, augmentant ainsi le risque de mutations oncogéniques (Pushalkar et al. 2018). Certaines pathobiontes sont capables de traverser la barrière intestinale, se disséminer dans la circulation sanguine puis d'interagir avec le micro-environnement tumoral mammaire, favorisant l'angiogenèse et l'échappement au système immunitaire (Yu et Zhao, 2018).

**CHAPITRES II :**  
**MATERIEL ET METHODES**

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

### I. Objectif

Dans cette partie expérimentale, nous nous sommes intéressés à l'étude de la flore commensale intestinale, orale et mammaire des carnivores domestiques (chattes et chiennes) atteints de tumeurs mammaires et celle d'animaux sains. Notre travail avait pour but d'identifier puis d'isoler en premier lieu les bactéries aéro-anaérobiques commensales, puis faire une étude comparative entre la flore commensale des animaux malades et sains.

#### Période de l'étude :

Notre étude expérimentale s'est déroulée du mois de Novembre 2022 au mois de Février 2024 à des périodes discontinues.

#### Lieu de l'expérimentation :

Principalement au niveau du laboratoire de microbiologie médicale de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

### II. Matériel

Nous avons utilisé différents appareils, matériaux et réactifs, suivant la nature des prélèvements obtenus.

#### II.1. Appareillage :

Appareils	Matériaux	Réactifs
- Autoclave	- Anse de platine	- Sachets de CO <sub>2</sub>
- Balance électronique	- Bec Bunsen	- Galerie API 20E
- Etuve bactériologique à 37°C	- Boîtes de Petri stériles	- Violet de Gentiane
- Microscope optique	- Ecouillons stériles	- Lugol
- Réfrigérateur	- Glacière	- Fuschine
- Vortex	- Jarre d'anaérobiose	- Alcool
	- Lames et lamelles	- Eau distillée
	- Micropipette	- Eau physiologique stérile
	- Portoirs de tubes	- Eau Oxygénée H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	- Tubes à essai stériles	
	- Pipette Pasteur boutonnée	

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

## II.2. Fiche d'enquête

Une fiche d'enquête a été réalisée et remplie moyennant les renseignements fournis par les propriétaires d'animaux (chats et chiens), contenant le motif de consultation et les commémoratifs cliniques.

Chaque prélèvement est accompagné par sa fiche d'enquête avec un code spécifique :

- **S** pour les animaux **Sains**
- **T** pour les animaux ayant une **Tumeur**
- **O** pour prélèvement **Oral**
- **I** pour prélèvement **Intestinal**
- **M** pour prélèvement **Mammaire**
- **A** pour les bactéries **Anaérobies**

## II.3. Nature des prélèvements

Un total de 14 échantillons a été prélevé dans des régions spécifiques sur sept animaux (chats et chiens) atteints de tumeurs mammaires et sept autres sains (qui ne présentent aucun signe clinique de maladie), venus pour une consultation au niveau de différents cabinets vétérinaire à Alger ainsi qu'au niveau de la clinique canine et chirurgie de l'ENSV, voir figure 1.

Figure 1 Réalisation des prélèvements sur une chienne



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

Afin d'analyser la composition microbienne, nos prélèvements ont été réalisés de manière aseptique par :

- **Ecouvillonnage** : à l'aide d'écouvillons stériles protégés par un tube en polypropène, transportés dans une glacière bien froide une fois collectée.
- **Mastectomie / Biopsie** : prélever un fragment de tissu de la masse mammaire par frottis

Tous les prélèvements ont été transportés dans une glacière froide afin d'éviter la multiplication des contaminants.

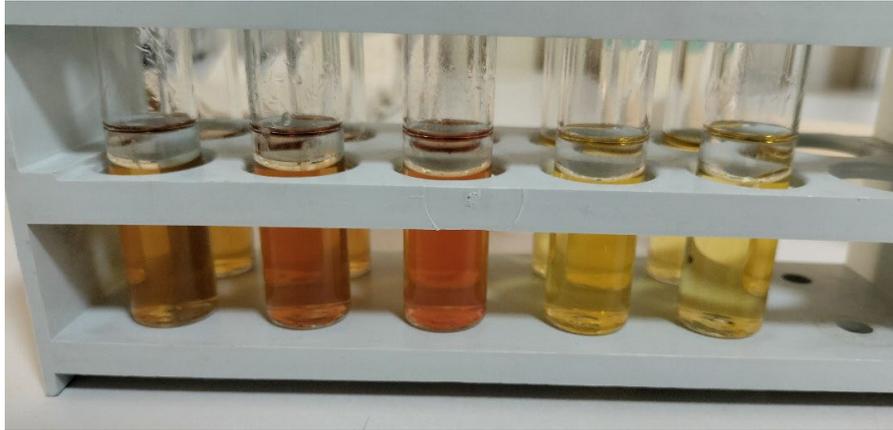
### III. Méthodes

#### III.1. Pré-Enrichissement :

Nous avons choisi d'utiliser principalement le bouillon BHIB, une base hautement nutritive non sélective et riche par ses composants (infusion de cœur de bœuf et de cervelle de veau déshydratée), qui répond aux besoins de croissance de nombreux types de micro-organismes, notamment les bactéries aérobies et anaérobies.

Chaque échantillon d'écouvillonnage (figure 2) est mis dans le bouillon BHIB et incubé à 37°C pendant 24 heures en condition aéro-anaérobique.

*Figure 2 Pré-Enrichissement des prélèvements sur bouillon BHIB*



Source : Photo personnelle prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

Pour la croissance des bactéries anaérobies, une couche d'huile de paraffine a été rajoutée en surface de quelques tubes dans le but d'assurer les conditions d'anaérobiose, impérative et nécessaire pour leur croissance. La durée d'incubation diffère à celle des bactéries aérobies, allant de 24h à quelques jours.

Un bouillon avec aspect trouble veut dire qu'il y a eu croissance bactérienne.

### **III.2. Isolement et mise en culture des bactéries :**

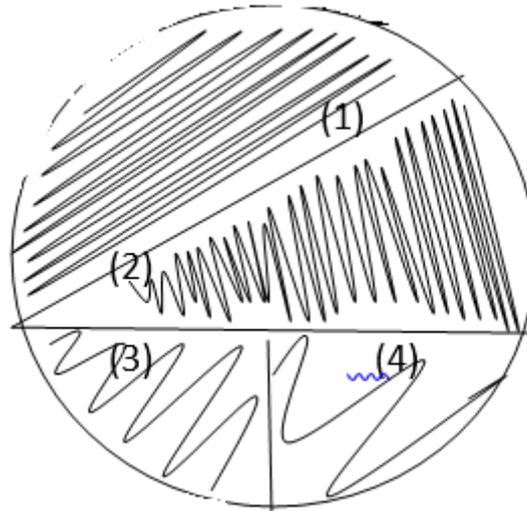
Pour bien étudier ces bactéries commensales, nous avons effectué une mise en culture à partir des bouillons pré-enrichies et codés précédemment, sur plusieurs milieux gélosés fraîchement préparés plus ou moins sélectifs. Chaque échantillon a été ensemencé de façon aseptique à l'aide du bec Bunsen

#### **III.2.1. Méthode d'ensemencement :**

Un inoculum prélevé à l'aide d'une micropipette ou d'une anse en platine stérile est déposé sur un point périphérique de la gélose puis disséminé par stries sur toute la surface de la boîte de Petri.

Il existe plusieurs méthodes d'isolement : par épuisement, par quadrant...Etc. voir figure 3

Figure 3 Méthode d'ensemencement par cadrans (Bensakhria A., 2018)



### III.2.2. Culture bactérienne

#### III.2.2.1. Les bactéries aérobies :

Tout en respectant la nature de l'endroit prélevé (cavité buccale, rectum ou surface de la mamelle), chaque bouillon a été ensemencé délicatement sur les milieux suivants :

#### A. Gélose EMB ou Eosine Méthylène Blue :

Est un milieu essentiellement utilisé pour l'isolement des coliformes (entérobactéries et autres bactéries aérobies) de la flore intestinale et orale, en raison de sa capacité à diffuser certaines colonies.

Sa composition joue un rôle crucial dans l'inhibition de la majeure partie de la flore Gram positif. Elle est composée principalement de :

- Eosine jaunâtre : colorant acide qui colore les colonies en rose
- Bleu de méthylène : inhibiteur de la respiration, agent sélectif
- Lactose : sucre fermenté par certaines entérobactéries
- Peptone de viande ou de gélatine : apport nutritif nécessaire pour la croissance des micro-organismes
- Phosphate dipotassique : source de phosphore, élément essentiel au métabolisme énergétique et aux processus anaboliques/cataboliques des bactéries.

Les entérobactéries, en fermentant le lactose, produisent de l'acide qui diffuse dans le milieu et transforme le bleu de méthylène en un dérivé incolore. Ces colonies apparaissent alors décolorées (incolores à centre rose foncé).

Les bactéries les plus isolées grâce à ce milieu, sont :

- *Escherichia coli* dont les colonies apparaissent d'une couleur vert-bleu métalliques avec un halo incolore dû à la décoloration.
- D'autres entérobactéries comme *Klebsiella* et *Enterobacter*, capables de fermenter le lactose.
- *Salmonella*, *Shigella* et *Proteus* forment des colonies d'aspect grisâtre car elles sont lactose-négatives (MARCHAL N et al., 1982)

La gélose EMB permet donc de diffuser et isoler rapidement les principales bactéries aérobies de la flore digestive et buccale.

Figure 4 Culture bactérienne sur gélose EMB



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

## B. Gélose Salmonella-Shigella

La gélose SS (Salmonella-Shigella) est un milieu sélectif permettant l'isolement des bactéries aérobies *Salmonella spp.* Et *Shigella spp.* À partir d'échantillons fécaux, buccaux ou intestinaux (Forbes et al. 2007). Son principe repose sur l'inhibition de la flore secondaire grâce au vert brillant, aux sels biliaires, aux fortes concentrations en thiosulfate et en citrate, limitant ainsi la croissance des entérobactéries commensales (Koneman et al. 2006).

Ce milieu chromogène permet la détection par changement de couleur des colonies de salmonelles et shigelles qui dégradent le saccharose ou le lactose en acides gras par fermentation (Montagna et al. 2008).

Bien que les antigènes H de *Salmonella* soient peu agglutinables, ce milieu favorise leur croissance sélective nécessaire à l'identification différentielle et au diagnostic (Forbes et al, 2007).

Le lactose, sucre réactif du milieu, permet de déceler la croissance éventuelle des coliformes (colonies rouges). En outre, les bactéries capables de produire de l' $H_2S$  par réduction du thiosulfate donnent en présence des ions fer des colonies à centre noir.

- Colonies lactose-positives : colonies rouges.
- Colonies lactose-négatives : colonies incolores.
- Colonies  $H_2S$ -positives : colonies à centre noir.

L'identification différentielle de *Shigella* sera envisagée à partir des colonies incolores, celle de *Salmonella* à partir des colonies incolores avec ou sans centre noir.

N.B. *Proteus vulgaris* et *mirabilis* donnent des colonies noires entourées d'un anneau transparent sans envahir le milieu.

Figure 5 Culture bactérienne sur gélose Salmonella-shigella



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

### C. Gélose de MacConkey

C'est un milieu sélectif et différentiel permettant de cultiver spécifiquement les entérobactéries, en éliminant la flore secondaire des produits polymicrobiens grâce à l'action de deux inhibiteurs :

- Le cristal violet (inhibition de la flore Gram-positive)
- Les sels biliaires (sélection des entérobactéries).

Sa composition inclut du lactose et du chlorure de sodium afin d'inhiber la croissance des staphylocoques et streptocoques. Elle contient également du bleu de bromothymol, un marqueur de pH, qui vire au jaune en présence d'acides gras volatils produits par les entérobactéries lors de la fermentation du lactose (Mason, 1951 et Marchal, 1982).

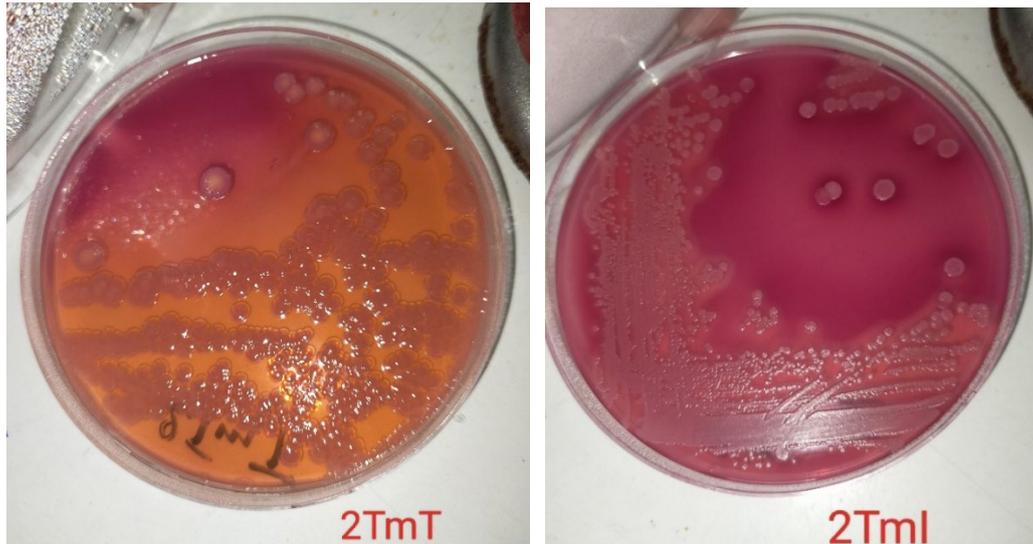
Les bactéries lactose-positives apparaissent sous forme de colonies de grandes tailles rouge brique à rose entourées d'un halo opaque dû à la précipitation des sels biliaires.

Les bactéries lactose-négatives apparaissent sous forme de colonies incolores.

Parmi les bactéries qu'on peut isoler grâce à ce milieu :

- ***Escherichia coli*** : Entérobactérie la plus fréquente sur ce milieu grâce à sa capacité à fermenter le lactose (Montagna et al., 2008).
- ***Klebsiella pneumoniae*** : Fermente le lactose (Lee, 2017).
- ***Enterobacter spp*** : Fermente le lactose (Holt et al., 1994).
- ***Proteus spp***: Bactéries mobiles telles que *P. mirabilis* et *P. vulgaris* catalysant la fermentation du lactose (Forbes et al., 2007).
- ***Citrobacter spp***: Fermente le lactose (Koneman et al., 2006).

Figure 6 Culture bactérienne sur gélose de MacConkey



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

#### D. Gélose MRS (De Man, Rogosa and Sharpe)

C'est un milieu sélectif permettant l'isolement et l'identification des bactéries lactiques de la flore intestinale et buccale, notamment les lactobacilles (Khalaf, 2017 ; Somkuti et al., 1995). Son principe repose sur la composition riche en extraits de viande, de levure et de glucose qui favorise la croissance de ces bactéries fermentaires.

Sur milieu gélosé MRS, les colonies de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* se développent de façon caractéristique (Holt et al., 1994), en effet, l'observation morphologique est importante pour distinguer ces genres bactériens et comprendre leurs rôles dans l'équilibre des écosystèmes buccaux et intestinaux (Forbes et al., 2007). La gélose MRS constitue donc un outil majeur pour le diagnostic qualitatif.

#### E. Gélose Chapman :

La gélose Chapman ou gélose au sel de mannitol (MSA pour Mannitol Salt Agar) est un milieu de culture sélectif semi-synthétique utilisé pour la sélection des bactéries halophiles, et plus particulièrement de celles qui fermentent le mannitol. Elle est plus particulièrement utilisée pour l'isolement des *Staphylococcus*.

D'autres bactéries, *Streptococcus D*, *Bacillus*, peuvent se développer sur ce milieu, mais les délais de croissance et l'aspect des colonies permettent de les différencier facilement. (Marchal N. et al., 1982).

Son principe repose sur l'addition de 7,5% de chlorure de sodium, concentration inhibitrice pour la plupart des bactéries sauf le genre *Staphylococcus* adapté à la forte salinité (Holt et al., 1994).

Le mannitol, source de carbone, permet la croissance des staphylocoques fermentant comme *S. aureus* qui acidifient le milieu, entraînant un virage au rouge de la phénolphtaléine (Koneman et al., 2006). Les colonies sont alors jaunes (Mannitol positif). A l'inverse, les colonies de *S. epidermidis* non fermentantes apparaissent blanches (Mannitol négatif) (Somkuti et al., 1995).

*Figure 7 Croissance de Staphylococcus sur gélose Chapman*



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

#### **F. Gélose au sang frais**

La gélose au sang frais est un milieu enrichi permettant de mettre en évidence l'hémolyse des bactéries aéro-anaérobies facultatives (Forbes et al., 2007). Son principe repose sur l'ajout de 5 % de sang de mouton total à la gélose Columbia, qui apporte les composants nécessaires à la croissance bactérienne (Holt et al., 1994).

*Figure 8 Gélose au sang frais*



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

L'incubation des souches sur ce milieu permet d'observer trois types d'hémolyses :

- L' $\alpha$ -hémolyse provoquant une lyse partielle des érythrocytes se traduisant par une zone verte autour des colonies

- L' $\beta$ -hémolyse entraînant une lyse complète se manifestant par une auréole transparente
- L'absence d'hémolyse (Koneman et al., 2006).

Ainsi, des bactéries comme le Streptocoque du groupe A, les Staphylocoques à coagulase positive et certaines entérobactéries peuvent être distinguées (Somkuti et al., 1995)

*Figure 9 Prélèvements sanguins des ovins de la ferme de l'ENSV pour la réalisation de la gélose au sang frais*



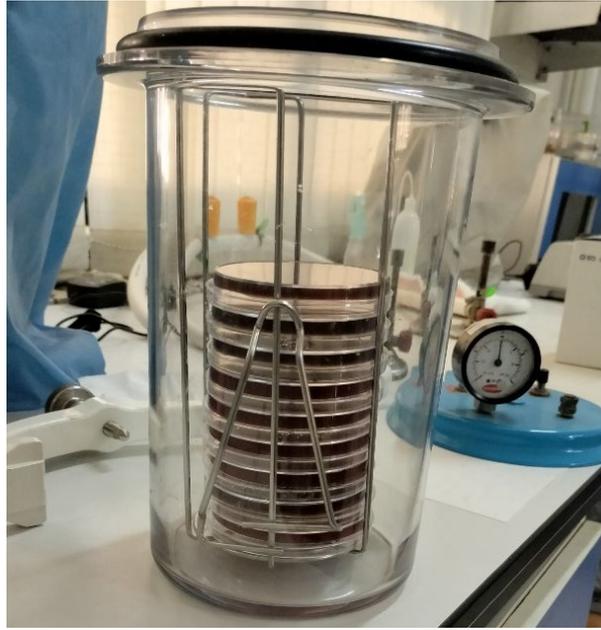
Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

Remarque : Après ensemencement, toutes les boîtes de Petri contenant des bactéries aérobies sont codées puis incubées en aérobiose à 37°C pendant 18 à 24 heures à l'étuve.

### **III.2.2.2. Pour les bactéries anaérobies :**

Les conditions d'anaérobiose impératives à leur croissance, sont assurées grâce aux sachets générateurs de condition anaérobie (Gaspak™ EZ), Mais aussi par des récipients étanches disponibles au niveau du laboratoire (jarres rectangulaires et rondes d'anaérobies, voir figure 10).

Figure 10 Jarre d'anaérobiose



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

Contrairement aux aérobies, les bactéries anaérobies croissent plus lentement. L'incubation des milieuxensemencés se fait à 37° dans l'étuve, pendant une période allant de 24 à 72 heures. La durée d'incubation varie en fonction du genre bactérien anaérobique étudié.

Selon les recherches de Jousimies-Somer et al, les durées d'incubations recommandées sont :

- Bactéries anaérobies facultatives (aérotolérantes) : 24-48h d'incubation, comme pour les aérobies.
- Bactéries anaérobies strictes :
  - Clostridium spp.: 18-24h à 48h d'incubation en conditions d'anaérobiose strictes (boîte anaérobique, poche anaérogénérateur). Entre 24h et 5 jours pour certaines espèces (C.difficile).
  - Bacteroides spp. : 24-48h d'incubation en conditions d'anaérobiose.
  - Bacillus fusiformis : 48-72h d'incubation.
  - Propionibacterium spp. : 5-10 jours d'incubation pour la croissance optimale.

#### **A. Gélose au sang frais**

Principalementensemencésur gélose Colombia au sang frais du fait de ses composants nutritifs, riche en acides aminés et en vitamines, mais aussi pour le sang de mouton ajouté, qui représente un milieu idéal pour la culture de différents germes y compris les anaérobies.

La gélose au sang frais nous permet de visualiser le pouvoir hémolytique des bactéries anaérobies, qui est une caractéristique importante pour leur identification.

## B. Iron Sulfite Agar (ISA)

Le milieu Iron Sulfite Agar (ISA) est lui aussi utilisé car c'est un milieu de culture sélectif pour l'isolement et le dénombrement spécifique des principales bactéries anaérobies sulfitoréductrices (Jousimies-Somer et al., 2002). Il contient du sulfate de fer (II) qui confère au milieu sa coloration gris-noire caractéristique et sert d'accepteur final d'électrons pour le métabolisme respiratoire de ces bactéries (Guzman et Van Broekhoven, 2020).

Les colonies des bactéries anaérobies se développant sur ce milieu se caractérisent par des zones de précipitation du fer autour d'elles, prenant une teinte grisâtre à noire en réduisant le fer ferrique en fer ferreux (Moore et coll., 2013). Après une incubation en atmosphère anaérobique à 35-37°C pendant 48-72h, le comptage des unités formant colonies (UFC) permet de quantifier spécifiquement la flore anaérobie cultivable d'un échantillon (Jousimies-Somer et coll., 2002).

Cette coloration noire/gris foncée des bactéries est due à l'activité sulfitoréductrice, c'est-à-dire leur capacité à utiliser les sulfites comme accepteur final d'électron lors de la respiration. Plus précisément, les bactéries sulfitoréductrices réduisent le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) présent dans le milieu en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Le fer ferreux produit, précipite alors et donne cette teinte noire/grisée autour de la colonie.

Les bactéries anaérobies strictes qui peuvent former des colonies noires sur ce milieu sont principalement :

- Les Bacteroides (ex: *Bacteroides fragilis*)
- Les Prevotella
- Les Fusobacterium
- Certains Clostridium comme *C. perfringens* ou *C. difficile*
- Les Veillonella
- Les Bilophila
- Eubacterium

La coloration noire/grisée des colonies sur Iron Sulfite Agar (voir figure 11) est donc un fort indicateur de bactéries anaérobies strictes avec activité sulfitoréductrice, parmi lesquelles les principaux représentants de la flore anaérobie habituelle.

Figure 11 Bactéries anaérobies sur gélose ISA avec présence de colonie sulfito-réductase



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

### III.3. Identification

#### III.3.1. Macroscopique

L'identification des germes dans ce cas est basée sur l'observation de l'aspect macroscopique des colonies obtenues à partir des déférents milieux d'isolement et d'enrichissement. Une fraction de chaque colonie caractéristique par boîte est soumise à une identification microscopique afin d'examiner la morphologie et la mobilité de chaque bactérie.

Cette observation servira de moyen d'orientation pour une identification plus approfondie. Il est à noter qu'elles ne sont retenues que les colonies dont l'examen microscopique révèle la présence de bacilles, de Cocci, spiralés, incurvés, ou en virgule Gram positif ou Gram négatif.

##### III.3.1.1. Aspect des colonies en surface sur milieu solide

###### A. La taille :

Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant des micromètres oculaires.

###### B. La forme :

- Allure des contours : lisses, dentelés, déchiquetés, irréguliers
- Relief : surface bombée, demi-bombée, plate.
- Centre : parfois surélève, parfois ombiliquée (en creux)

### **C. L'aspect de la surface :**

La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueux, renvoie la lumière de façon à donner un reflet métallique ou un aspect irisé.

### **D. L'opacité :**

Les colonies sont décrites comme :

- Opaques (ne laissent pas passer la lumière)
- Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes à travers, comme du verre dépoli)
- Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes à travers, comme du verre, on parle de gouttes de rosé)

### **E. La consistance :**

Au moment du prélèvement, il est possible de remarquer la consistance des colonies : Grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).

### **F. La couleur et/ou pigment :**

Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Cependant, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donne un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge ...), tandis que d'autres, produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu.

### **G. Aspect des colonies en profondeur :**

- Colonies régulières en formes de lentilles,
- Colonies irrégulières de formes diffuses et floues

## **III.3.2. Microscopique : Coloration de Gram**

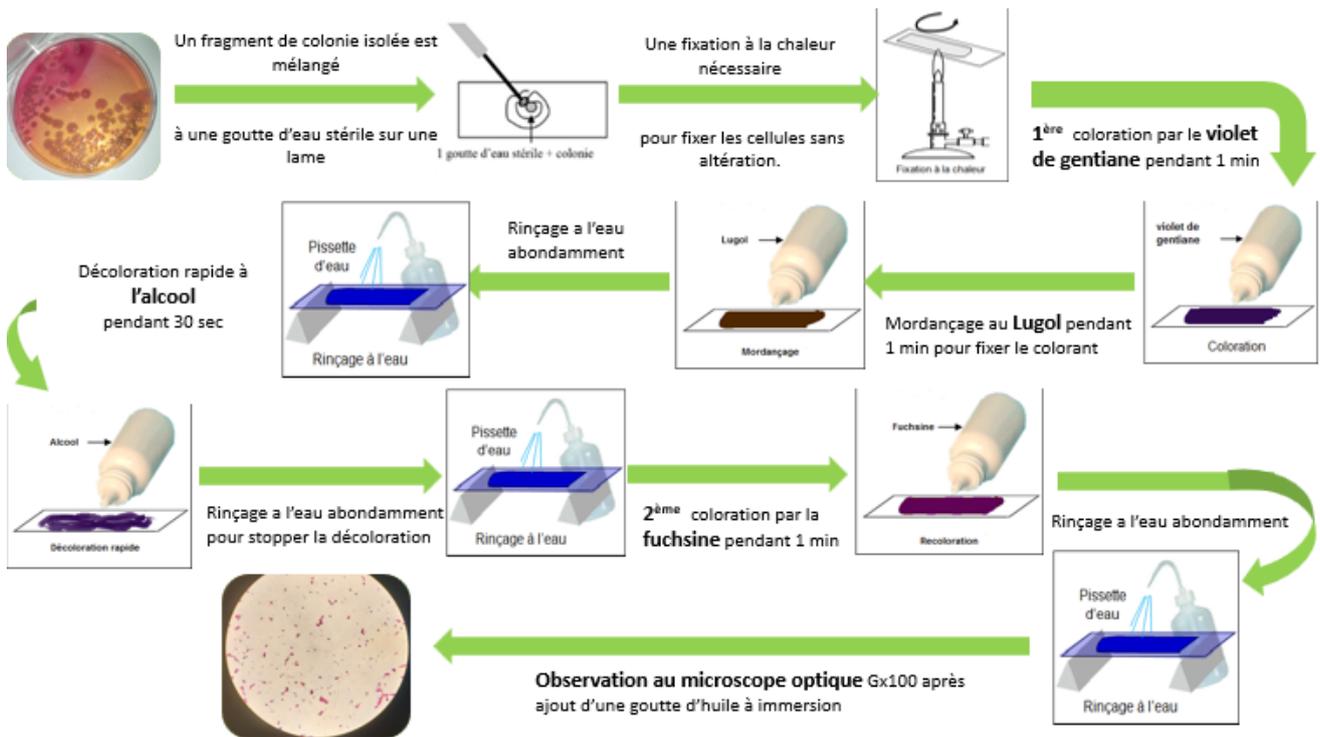
La coloration de Gram est une méthode de coloration différentielle permettant une identification rapide des bactéries et apporte des informations sur leur physiologie. Le principe repose sur les différences de composition de la paroi cellulaire bactérienne.

Après fixation des bactéries sur une lame, une première étape consiste à les colorer avec le violet de gentiane puis un mordantage au Lugol. Cette coloration est retenue par le peptidoglycane des parois des « Gram positif » mais passe au travers de la paroi plus fine des Gram négatif (Forbes et al., 2007).

Une étape de décoloration à l'alcool est ensuite réalisée pour éliminer le colorant des Gram négatif. Enfin, une contre-coloration à la fuchsine de Ziehl-Neelsen permet de colorer en rose les bactéries décolorées « Gram négatif » (Koneman et al., 2006).

Sous microscope, les bactéries à Gram positive possédant une double couche de membrane cellulaires apparaissent en violet, tandis que les bactéries Gram négative possédant une seule couche apparaissent en rose.

Figure 12 Schéma représentatif de la coloration de Gram



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

### III.4. Caractérisation biochimique

#### III.4.1. Les bactéries aérobies

Afin de pouvoir identifier les espèces des germes intestinaux, nous avons utilisé les galeries API 20E.

Les galeries API 20E sont un système standardisé permettant l'identification des bacilles à Gram négatif non fastidieux appartenant aux *Enterobacteriaceae* et autres familles grâce à 21 tests biochimiques miniaturisés. Elle repose sur la mise en évidence directe des enzymes présentes dans chaque genre bactérien.

Le principe se base sur l'inoculation d'une suspension bactérienne dans les 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Après 18 à 24h d'incubation à 36°C, les réactions produites lors de l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs.

Après lecture des résultats à l'aide du tableau fourni, l'identification est obtenue par comparaison du profil numérique généré avec la base de données du logiciel. (BioMérieux, 2010)

Figure 13 Galerie API 20E de l'échantillon S04



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

### III.4.2. Les bactéries anaérobies

Nous avons utilisé principalement des tests de la catalase et d'urée-indole.

#### III.4.2.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui engendre le clivage du  $H_2O_2$  (peroxyde d'hydrogène) en  $H_2O$  (eau) avec libération d' $O_2$  qui se dégage sous forme gazeuse.

La mise en évidence de la catalase est établie en mettant une colonie suspecte à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile sur une lame porte-objet propre contenant une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3%.

Le résultat apparaît après 30 secondes, la catalase est positive si on observe une effervescence, voir figure 14 sinon, la catalase est négative.

Figure 14 Test de catalase + : présence d'effervescence



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

#### III.4.2.2. Test d'urée indole

Le test urée indole est un test biochimique double, permettant d'identifier et de différencier les bactéries à travers leur capacité à dégrader l'urée et à produire de l'indole (Guéguen et al., 2010).

Il repose sur l'inoculation de deux milieux de culture contenant soit de l'urée, soit du tryptophane. Dans le milieu à l'urée, une enzyme bactérienne (uréase) transforme cette dernière en ammoniac et dioxyde de carbone. L'ammoniac alcalinise le milieu et fait virer l'indicateur de pH au rouge (MacFaddin, 2000).

Dans le milieu au tryptophane, certaines bactéries possèdent une enzyme (tryptophanase) catalysant la production d'indole, de pyruvate et d'ammoniac. L'ajout du réactif de Kovacs permet de révéler la présence d'indole par un anneau rouge à l'interface (Moore et Moore, 1995).

Un test urée positif correspond à une coloration rouge du milieu urée, voir la figure 15. Un test indole positif à un anneau rouge après ajout du réactif de Kovacs.

Ce test permet donc d'identifier et de différencier les principales entérobactéries (Baron, 1996).

Figure 15 Résultats du test urée indole



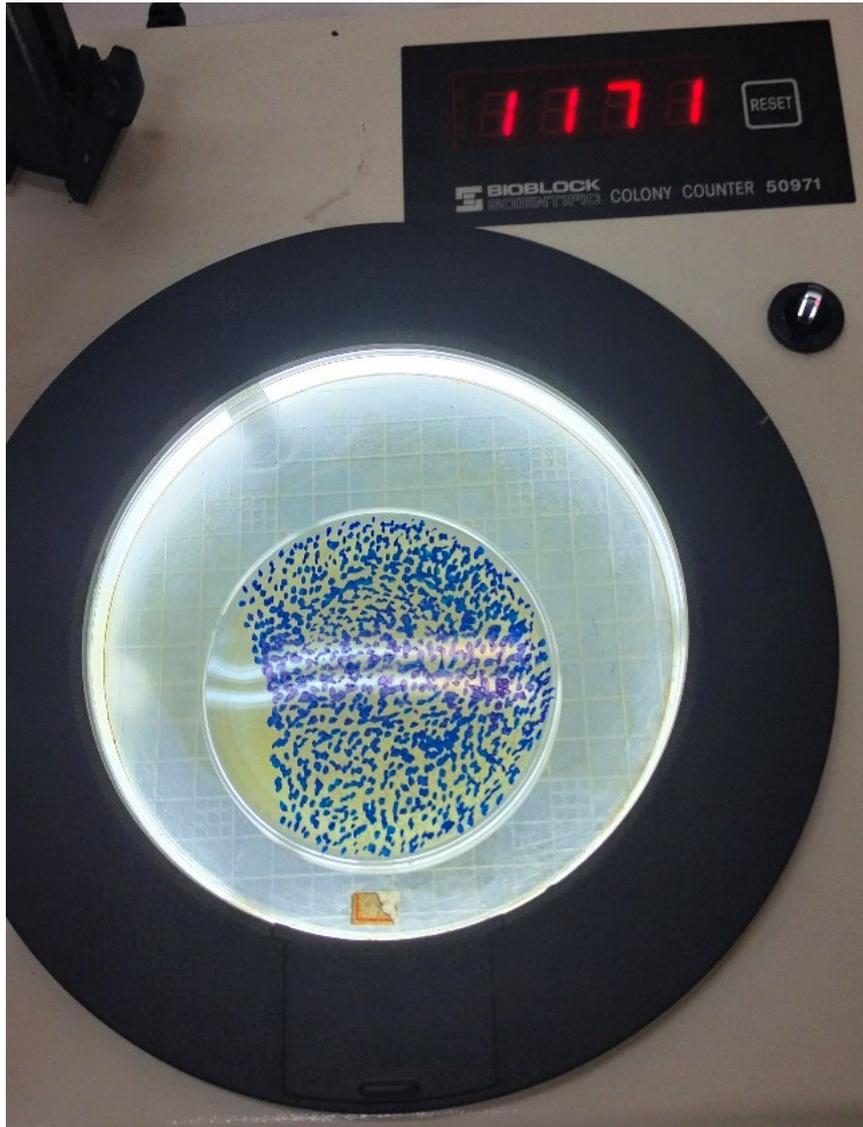
Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

### III.5. Dénombrement des bactéries anaérobies

Pour le dénombrement des bactéries anaérobies, nous avons utilisé la gélose ISA (Iron Sulfit Agar). C'est un milieu sélectif permettant le dénombrement des bactéries anaérobies comme les *Bacteroides*, *Clostridium* et *Fusobacterium* (Rolfe et Finegold, 1977).

Après une incubation en atmosphère anaérobie à 35-37°C pendant 48-72h, le comptage des unités formant colonies (UFC) permet de quantifier spécifiquement la flore anaérobie cultivable d'un échantillon (Jousimies-Somer et coll., 2002).

Figure 16 Dénombrement bactérien sur gélose ISA



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

**CHAPITRES III :**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

### CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Au cours de notre étude expérimentale, effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie médicale de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, nous nous sommes intéressés à l'étude de la flore commensale intestinale, orale et mammaire des carnivores domestiques sains et malades. Notre travail avait pour but d'identifier et d'isoler les bactéries aéro-anaérobiques commensales, puis faire une étude quantitative entre la flore commensale des animaux malades et sains.

#### I. Recueil des commémoratifs

Notre étude a porté sur 14 animaux domestiques venus pour une consultation en cabinet vétérinaire privé et au niveau de la clinique canine et chirurgie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger les résultats sont montrés dans le **Tableau 5** et le **Tableau 6**.

##### I.1. Pour les animaux sains

Tous les animaux sains sans tumeur mammaire sont vaccinés et ne présentent aucune pathologie ou signe de maladie

*Tableau 5 Recueil commémoratif des animaux sains*

Animaux	Espèces	Age	Etat général
S01	Féline	7 ans	Bon
S02	Féline	5 ans	Bon
S03	Canine	2 ans	Bon
S04	Féline	8 mois	Bon
S05	Féline	1ans et demi	Bon
S06	Féline	6 mois	Bon
S07	Canine	5 ans	Bon

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Les animaux sains sont majoritairement représentés par l'espèce féline, âgés entre 6 mois et 7 ans. Deux chiens ont également fait objet de consultation (S03, S07), âgés de 2 ans et 5 ans. Nous observons que l'état général de nos sept animaux est bon.

## I.2. Pour les animaux atteints de tumeur :

La majorité des animaux présentant des tumeurs mammaires étaient vaccinés et vermifugés. Nous avons pu grâce à l'analyse histopathologique identifier et classer les tumeurs mammaires en malignes et bénignes.

*Tableau 6 Recueil commémoratif des animaux atteints de tumeurs*

	Espèces	Age	Etat général	Type de tumeur mammaire
T01	Féline	5 ans	Bon	Papillome intracanalair non infiltrant
T02	Féline	1 an	Bon	Carcinome tubulaire
T03	Féline	12 ans	Bon	Carcinome tubulo-lobulaire non infiltrant
T04	Canine	10 ans	Bon	Carcinome canalaire infiltrant
T05	Féline	3 ans	Bon	Adénome du mamelon
T06	Canine	11 ans	Moyen à Bon	Carcinome lobulaire in situ
T07	Canine	11 ans	Bon	Carcinome canalaire et lobulaire

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Le **Tableau 6** présente des cas de tumeurs mammaires chez deux espèces : féline (4 cas) et canine (3 cas). L'âge des félins varie de 1 à 12 ans, tandis que celui des canins varie de 10 à 11 ans.

On observe une distribution d'âge relativement plus large chez les félins comparé aux canins, avec une incidence de tumeurs à un âge plus avancé chez ces derniers. L'âge semble être un facteur important, en particulier pour les canins où les cas de tumeurs sont observés chez des individus plus âgés (10-11 ans). Cela pourrait suggérer une corrélation entre l'âge avancé et la prévalence des tumeurs mammaires chez les canins. Chez les félins, bien que l'incidence des tumeurs soit également présente chez les individus plus jeunes (1 an), les tumeurs chez les félins plus âgées (12 ans) sont également observées. Cela indique que, bien que l'âge puisse être un facteur, d'autres éléments (génétiques, environnementaux, etc.) pourraient également jouer un rôle significatif (Keravel, O., 2022).

L'état général de la majorité des animaux est "Bon", à l'exception d'un cas canin où l'état est noté comme "Moyen à Bon". Cette observation pourrait suggérer que l'état général n'est pas nécessairement un facteur déterminant pour la présence de tumeurs mammaires, bien que des études plus approfondies soient nécessaires pour confirmer cela, mais aussi qu'à un certain stade de la progression tumorale, il y a une possible dégradation de l'état général, ce qui mérite une attention particulière pour des diagnostics et interventions précoces.

Les félins présentent une variété de types de tumeurs : papillome intracanalair non infiltrant, carcinome tubulaire, carcinome tubulo-lobulaire non infiltrant et adénome du mamelon. Les canins, en revanche, montrent une prédominance des carcinomes : carcinome canalaire infiltrant, carcinome lobulaire in situ, et carcinome canalaire et lobulaire. Les types de tumeurs mammaires observés varient donc significativement entre les deux espèces, avec une diversité plus large chez les félins. Cette observation pourrait indiquer une tendance des tumeurs mammaires canines à évoluer vers des formes malignes plus fréquemment que chez les félins.

## **II. Analyses microbiologiques**

### **II.1. Cultures bactériennes**

Dans le cadre de notre étude, nous avons employé divers milieux de culture aérobie et anaérobie. Ces derniers ont servi à effectuer des prélèvements variés au niveau oral, mammaire et intestinal de chaque animal. Les croissances bactériennes ont été marquées comme suite :

« - », pas de croissance

« +/- », croissance très faible ou douteuse

« + », faible croissance

« ++ », croissance moyenne

« +++ », forte croissance

« ++++ », croissance excessive

#### **II.1.1. En aérobiose**

##### **II.1.1.1. Prélèvement oral**

Le tableau 7 représente les croissances bactériennes souches (S01 à S07 et T01 à T07) sur divers milieux de culture : Gélose au sang frais, MacConkey, EMB, Salmonella-shigella, MRS, et Chapman en aérobiose à partir de prélèvements oraux.

Tableau 7 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en aérobiose pour les prélèvements oraux

	Gélose au sang frais	MacConkey	EMB	Salmonella-shigella	MRS	Chapman
S01	++	+/-	-	+/-	+	-
S02	+	+	+/-	-	-	-
S03	++	+	+	-	-	-
S04	++	+	+	-	-	-
S05	+++	+	+	-	-	-
S06	+	+	+++	++	-	-
S07	+++	++	+++	++	-	-
T01	++	+++	+++	++	-	+
T02	+++	++	++	+	-	-
T03	++	++	++	++	+	-
T04	++	+++	+++	++	-	+
T05	+	++	+++	+	-	-
T06	+	++	++	+	-	+/-
T07	++	+	++	++	+/-	+/-

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Pour la gélose au sang frais : Les souches S01, S03, S04, T01, T03, T04 et T07 montrent une croissance moyenne (++) , avec une forte croissance (+++) observée pour S05 et S07 et T02. La majorité des souches ont au moins une croissance faible, indiquant une capacité de ces bactéries à croître sur un milieu nutritif non sélectif riche en nutriments.

Pour le milieu MacConkey : Les souches T01, T04 montrent une forte croissance (+++), ce qui pourrait indiquer la présence de bactéries Gram-négatif lactose-positif. Les souches S02, S03, S04, S05, S06, S07, T02, T03, T05, T06, et T07 montrent une croissance faible à moyenne, suggérant la présence de bactéries Gram-négatif avec diverses capacités de fermentation du lactose. Cela suggère une prévalence de bactéries Gram-négatif parmi les échantillons, avec une capacité variable de fermentation du lactose (ABBOTT et al., 2015).

Pour le milieu EMB : Les souches S02, S03, S04, S05 montrent une croissance très faible à faible. Les souches T02, T03, T06 et T07 montrent une croissance moyenne. Les souches S06, S07, T01, T04 et T05 montrent une forte croissance, ce qui pourrait indiquer la présence de coliformes à fortes fermentatrices du lactose (MARCHAL N et al., 1982).

Pour le milieu Salmonella-shigella : Les souches T02, T05 et T06 montrent une croissance faible. Les souches S06, S07, T01, T03, T04, T07 montrent une croissance moyenne. Les souches S02, S03, S04 et S05 n'ont montré aucune croissance, indiquant l'absence probable de Salmonella ou Shigella (Vandepitte, J. 2003).

Pour le milieu MRS Les souches S01, T03, T07 montrent une croissance très faible à faible. Les autres souches n'ont montré aucune croissance, ce qui suggère une faible présence de lactobacilles (Khalaf, 2017).

Pour le milieu Chapman : Seules les souches T01, T04, T06 et T07 montrent une très faible à faible croissance, ce qui pourrait indiquer la présence de staphylocoques (Koneman et al., 2006).

L'analyse des croissances bactériennes sur divers milieux de culture révèle une hétérogénéité notable parmi les échantillons étudiés. La majorité des souches présentent une croissance sur des milieux sélectifs pour les Gram-négatif, avec des capacités variables de fermentation du lactose. La faible croissance sur des milieux spécifiques comme MRS et Chapman indique une présence limitée de lactobacilles et de staphylocoques. Ces résultats fournissent des informations précieuses pour la caractérisation microbiologique des échantillons, permettant de mieux comprendre la composition bactérienne et ses implications potentielles pour la santé des animaux étudiés.

#### II.1.1.2. Prélèvement mammaire

Le tableau 8 représente les croissances bactériennes souches (S01 à S07 et T01 à T07) sur divers milieux de culture : Gélose au sang frais, MacConkey, EMB, Salmonella-shigella, MRS, et Chapman à partir de prélèvements mammaires.

*Tableau 8 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en aérobiose pour le prélèvement mammaire*

	Gélose au sang frais	MacConkey	EMB	Salmonella-shigella	MRS	Chapman
S01	++	-	+/-	-	-	++
S02	+	-	+/-	-	-	+
S03	++	-	+	-	-	+
S04	++	+	-	-	-	+
S05	+	+	-	-	-	+
S06	+	-	-	-	-	+
S07	+++	-	-	-	-	+
T01	++	+/-	+	-	-	++
T02	+	+	+	-	-	++
T03	++	+	++	-	-	+
T04	++	+	++	-	-	+++
T05	+	+	+	-	-	+
T06	++	-	-	-	-	++
T07	++++	+	+	-	-	+++

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Pour la gélose au sang frais : Les échantillons S02, S05, S06, T02 et T05 montrent une croissance faible. S01, S03, S04, T01, T03, T04, et T06 montrent une croissance moyenne, cependant, S07 et T07 montrent une très forte croissance voir excessive sur ce milieu. Ceci indique que la plupart des échantillons ont une bonne capacité de croissance sur un milieu nutritif non sélectif.

Pour le milieu MacConkey : Les échantillons S01, S02, S03, S06, S07 et T06 montrent une absence de croissance indiquant une absence probable de bactéries Gram-négatif. S04, S05, T01, T02, T03, T04, T05, et T07 montrent une faible à très faible croissance, suggérant une présence limitée de bactéries Gram-négatives (ABBOTT et al., 2015).

Pour le milieu EMB : Les échantillons S01, S02, S03, T01, T02, T05 et T07 montrent une croissance très faible voir faible, indiquant une présence minimale de coliformes. T03 et T04 montrent une croissance moyenne, indiquant la présence de coliformes. S04, S05, S06, S07 et T06 montrent une absence de croissance, ce qui pourrait suggérer une absence de coliformes (MARCHAL N et al., 1982).

Pour le milieu Salmonella-shigella et le milieu MRS : Aucun des échantillons ne montre de croissance, ce qui indique une absence probable de Salmonelles, Shigelles et de lactobacilles (Vandepitte, J. 2003).

Pour le milieu Chapman : Les échantillons S02, S03, S04, S05, S06, S07, T03, et T05 montrent une croissance faible, suggérant une présence limitée des staphylocoques. S01, T01, T02, T04, T06 et T07 montre une croissance moyenne à forte indiquant une forte présence de staphylocoques (Koneman et al., 2006).

L'analyse des croissances bactériennes sur différents milieux de culture révèle une prédominance de staphylocoques parmi certains échantillons, avec une présence limitée de bactéries Gram-négatives. Ces résultats fournissent des informations importantes pour la caractérisation microbiologique des échantillons et permettent de mieux comprendre la composition bactérienne dans le contexte des prélèvements mammaires.

### **II.1.1.3. Prélèvement intestinal**

Le tableau 9 représente les croissances bactériennes souches (S01 à S07 et T01 à T07) sur divers milieux de culture : Gélose au sang frais, MacConkey, EMB, Salmonella-shigella, MRS, et Chapman à partir de prélèvements intestinaux.

Tableau 9 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en aérobiose pour le prélèvement intestinal

	Gélose au sang frais	MacConkey	EMB	Salmonella-shigella	MRS	Chapman
S01	++	++	++	+	++	-
S02	++	++++	+++	+	+	-
S03	++	++	+	++	+	+
S04	++	++	++	-	+	-
S05	+++	++	+++	+	+	-
S06	+	++	+++	+	+	-
S07	+++	++	++	+	+	-
T01	++	++	++++	++	+	+
T02	++++	++++	++++	++	+/-	+
T03	++	++++	++++	++	++	++
T04	++++	++++	++	++	+++	-
T05	++++	++++	++	++	++	+
T06	++++	++++	++	+	-	+
T07	++++	++++	+++	+	++++	+

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Pour la gélose au sang frais : La majorité des échantillons montrent une croissance très forte voir excessive : S05, S07, T02, T04, T05, T06, et T07. Ceci indique que la plupart des échantillons ont une bonne capacité de croissance sur un milieu nutritif non sélectif.

Pour le milieu MacConkey : Tous les échantillons montrent une croissance moyenne à excessive suggérant une présence de bactéries Gram-négatif (ABBOTT et al., 2015).

Pour le milieu EMB La croissance varie de faible à forte : S01, S03, S04, S07, T04, T05 et T06 montrent une croissance faible à moyenne. S02, S05, S06, T01, T02, T03 et T07 montrent une croissance forte à excessive. Cela suggère la présence de coliformes, avec une forte capacité de fermentation du lactose parmi plusieurs échantillons (MARCHAL N et al., 1982).

Sur le milieu Salmonella-Shigella : Les échantillons montrent principalement une croissance faible) à moyenne, avec une exception (absence de croissance pour S04). Cela indique une potentielle présence de pathogènes (Vandepitte, J. 2003).

Pour le milieu MRS : Les échantillons T04 et T07 montrent une très forte croissance suggérant la présence de lactobacilles. Les autres échantillons présentent une absence ou une très faible croissance suggérant l'absence ou la présence limitée de lactobacilles (Khalaf, 2017).

Pour le milieu Chapman : La majorité des échantillons montrent une absence de croissance (-), sauf S03, T01, T02, T03, T05, T06 et T07 montrant une faible ou moyenne croissance. Cela suggère une faible présence de staphylocoques parmi les échantillons (Koneman et al., 2006).

L'analyse des croissances bactériennes sur différents milieux de culture révèle une diversité microbienne significative dans les prélèvements intestinaux, avec une prédominance de bactéries Gram-négatives et coliformes. La présence limitée de pathogènes spécifiques comme Salmonella et Shigella, ainsi que de lactobacilles et de staphylocoques, fournit des informations importantes pour la caractérisation microbiologique des échantillons intestinaux.

## II.1.2. En anaérobiose

### II.1.2.1. Prélèvement oral

Le tableau 10 représente les croissances bactériennes souches (S01 à S07 et T01 à T07) sur deux milieux de culture : Gélose au sang frais et ISA (Iron Sulfite Agar) en anaérobiose à partir de prélèvements oraux.

*Tableau 10 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en anaérobiose pour le prélèvement oral*

	Gélose au sang frais	ISA (Iron Sulfite Agar)
S01	++	+
S02	+	+/-
S03	++	+
S04	++	+
S05	+	+/-
S06	++	+
S07	+	+/-
T01	+++	++
T02	++	+/-
T03	+++	+
T04	++	+/-
T05	+++	++
T06	+++	++
T07	+++	++

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Nous remarquons, que la gélose au sang frais semble plus favorable à la croissance bactérienne anaérobique par rapport à l'ISA, comme le montrent les résultats de tous les échantillons, où la croissance est plus forte sur la gélose au sang frais. Indiquant une certaine polyvalence de ces souches dans différentes conditions de culture.

Les souches S02, S05, S07, T02 et T04 montrent une croissance très faible ou douteuse sur ISA, ce qui pourrait indiquer que ces souches sont plus sensibles aux conditions spécifiques de ce milieu ou que ce milieu n'est pas optimal pour leur croissance.

Les souches S02, S05 et S07 montrent une croissance faible voir très faible sur les deux milieux, suggérant que cette souche pourrait être globalement moins vigoureuse ou nécessiter des conditions de culture très spécifiques qui ne sont pas fournies par les milieux testés.

La capacité de certaines souches à croître dans des conditions anaérobies sur des milieux spécifiques peut avoir des implications cliniques, notamment pour les infections orales où l'anaérobiose est souvent présente.

### II.1.2.2. Prélèvement mammaire

Le tableau 11 représente les croissances bactériennes souches (S01 à S07 et T01 à T07) sur deux milieux de culture : Gélose au sang frais et ISA (Iron Sulfit Agar) en anaérobiose à partir de prélèvements mammaires.

*Tableau 11 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en anaérobiose pour le prélèvement mammaire*

	Gélose au sang frais	ISA (Iron Sulfit Agar)
S01	++	+
S02	++	+
S03	+	+/-
S04	+	+
S05	++	++
S06	+	+
S07	+++	+
T01	+++	+++
T02	+++	++++
T03	+++	+++
T04	+++	++
T05	+++	++
T06	+++	++++
T07	+++	++

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Nous observons que les deux milieux de culture, permettent une bonne croissance bactérienne, mais certaines souches montrent des préférences distinctes pour un milieu par rapport à l'autre.

Les échantillons T02 et T06 montrent une croissance excessive sur l'ISA, indiquant une présence notable de bactéries sulfito-réductrices. Ceci peut avoir des implications pour la santé mammaire, car certaines bactéries sulfito-réductrices peuvent être pathogènes.

La gélose au sang frais permet une croissance forte pour un plus grand nombre de souches (S07, T01, T02, T03, T04, T05, T06, T07), suggérant qu'elle est généralement plus favorable pour ces souches. Les échantillons S03, S04 et S06 montrent une croissance faible sur les deux milieux, ce qui pourrait indiquer des besoins spécifiques en nutriments ou des conditions de culture non optimales fournies par ces milieux.

L'analyse des croissances bactériennes sur des milieux anaérobies révèle une diversité microbienne parmi les prélèvements mammaires. La gélose au sang frais montre une forte capacité de croissance bactérienne dans des conditions anaérobies pour plusieurs échantillons, tandis que l'ISA met en évidence la présence de bactéries sulfito-réductrices dans certains échantillons. Ces résultats fournissent des informations importantes pour la caractérisation microbiologique des échantillons mammaires et peuvent avoir des implications pour la compréhension des infections et des dysbioses dans le tissu mammaire.

### II.1.2.3. Prélèvement intestinal

Le tableau 12 représente les croissances bactériennes souches (S01 à S07 et T01 à T07) sur deux milieux de culture : Gélose au sang frais et ISA (Iron Sulfite Agar) en anaérobiose à partir de prélèvements intestinaux.

*Tableau 12 Croissance bactérienne sur différents milieux de culture en anaérobiose pour le prélèvement intestinal*

	Gélose au sang frais	ISA (Iron Sulfite Agar)
S01	++	+
S02	++	+/-
S03	++	+
S04	++	+
S05	++	+/-
S06	++	+
S07	++	+/-
T01	+++	++
T02	+++	++++
T03	+++	++++
T04	+++	++
T05	++	+++
T06	+++	++++
T07	++	++

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Nous constatons que toutes les souches sont capables de croître sous des conditions anaérobies sur les deux types de milieux de culture. Cependant, il existe une variation significative dans l'étendue de cette croissance. Cela pourrait être dû à des différences dans la composition des bactéries présentes dans chaque échantillon ou à la manière dont différentes bactéries réagissent aux composants de chaque milieu.

Les échantillons T02, T03 et T06 montrent une croissance excessive sur l'ISA, indiquant une présence notable de bactéries sulfito-réductrices. Ceci peut avoir des implications pour la santé intestinale, car certaines bactéries sulfito-réductrices peuvent être pathogènes ou jouer un rôle dans les processus inflammatoires.

La gélose au sang frais permet une croissance forte pour un plus grand nombre de souches (S07, T01, T02, T03, T04, T06), suggérant qu'elle est généralement plus favorable pour ces souches. Les échantillons S02, S05 et S07 montrent une croissance très faible sur le milieu ISA, ce qui pourrait indiquer des besoins spécifiques en nutriments ou des conditions de culture non optimales fournies par ce milieu.

Ces résultats fournissent des informations cruciales pour la caractérisation microbiologique des échantillons intestinaux. Ils offrent des perspectives prometteuses pour la compréhension des infections intestinales, des déséquilibres microbiens (dysbioses), et des processus inflammatoires affectant le tractus intestinal. La capacité à distinguer entre différents types de bactéries en fonction du milieu de culture utilisé permet une analyse plus fine et ciblée des écosystèmes microbiens intestinaux.

De plus, ces données peuvent guider le choix des milieux de culture dans les diagnostics microbiologiques, permettant ainsi une identification plus précise des agents pathogènes et une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux déséquilibres microbiens

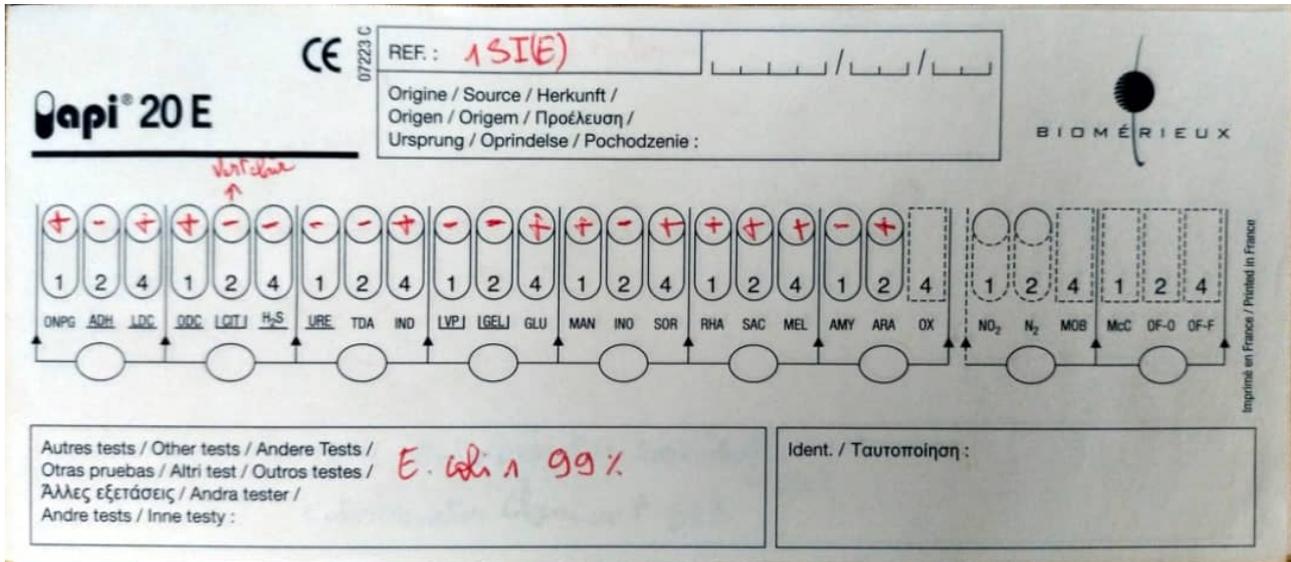
## **II.2. Caractéristique biochimique**

### **II.2.1. Pour les bactéries aérobies :**

Nous avons utilisé essentiellement les galeries API 20E, ce qui nous a donné une identification bactérienne plus précise en termes de genre et d'espèces pour les entérobactéries isolées à partir des prélèvements oraux intestinaux et mammaires.

Après lecture des tests biochimique sur la galerie API 20E, nous avons transcrit les résultats obtenus sur la fiche de la galerie (figure 17), puis dans le système d'identification bactérienne API 20E.

Figure 17 Interprétation de caractère biochimique sur API 20E



Source : Photo prise par BENZEID.N, ENSV 2024.

Les bactéries identifiées grâce à API 20E, sont :

- *Citrobacter freundii* avec une probabilité de 41%
- *Citrobacter Youngae* avec une probabilité de 51%
- *Entérobacter Cloacae* avec une probabilité de 43%
- *Entérobacter sakazakii* avec une probabilité de 96%
- *Escherichia Coli* avec une probabilité de 99%
- *Salmonella spp* avec une probabilité de 63%
- *Serratia odorifera* avec une probabilité de 90%

### II.2.1. Pour les bactéries anaérobies :

Nous avons réalisé quelques tests pouvant nous orienter dans l'identification des bactéries anaérobies des flores bactériennes étudiées.

Les tableaux 11, 12, 13 représentent les tests biochimiques Urée indole et catalase, réalisé à partir des prélèvements oraux, intestinaux, mammaire (S01 à S07 et T01 à T07)

**Flore orale***Tableau 13 Représentent les tests biochimiques Urée indole et catalase sur la flore orale*

	Urée	Indole	Catalase
S01	+	-	-
S02	-	+	-
S03	-	-	-
S04	+	-	-
S05	-	+	-
S06	-	-	-
S07	-	-	-
T01	+	-	-
T02	-	+	-
T03	+	-	-
T04	+	+	-
T05	+	-	-
T06	+	+	-
T07	-	-	-

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Pour l'Urée ; 5 échantillons du groupe S sont négatifs, et 2 sont positifs. 5 échantillons du groupe T sont positifs, et 2 sont négatifs.

Pour l'Indole ; 5 échantillons du groupe S sont négatifs, et 2 sont positifs. 4 échantillons du groupe T sont négatifs, et 3 sont positifs.

Tous les échantillons sont négatifs pour ce test, ce qui indique une absence d'activité catalase dans ces bactéries de la flore orale.

**Flore mammaire***Tableau 14 Représentent les tests biochimiques Urée indole et catalase sur la flore mammaire*

	Urée	Indole	Catalase
S01	+	-	-
S02	-	+	-
S03	-	-	-
S04	+	-	-
S05	-	+	-
S06	-	-	-
S07	-	-	-
T01	-	-	-
T02	+	+	-
T03	-	-	-
T04	+	+	-
T05	+	-	-
T06	-	+	-
T07	+	-	-

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Pour l'Urée ; 5 échantillons du groupe S sont négatifs, et 2 sont positifs. 4 échantillons du groupe T sont positifs, et 3 sont négatifs.

Pour l'Indole ; 5 échantillons du groupe S sont négatifs, et 2 sont positifs. 4 échantillons du groupe T sont négatifs, et 3 sont positifs.

Tous les échantillons sont négatifs pour ce test, ce qui indique une absence d'activité catalase dans ces bactéries de la flore orale.

**Flore Intestinales :***Tableau 15 Représentent les tests biochimiques Urée indole et catalase sur flore intestinale*

	Urée	Indole	Catalase
S01	+	-	-
S02	-	+	-
S03	-	-	-
S04	+	-	-
S05	-	+	-
S06	-	-	-
S07	-	-	-
T01	+	-	-
T02	+	+	-
T03	+	-	-
T04	+	+	-
T05	+	-	-
T06	+	+	-
T07	+	-	-

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Pour l'Urée ; 5 échantillons du groupe S sont négatifs, et 2 sont positifs. Tous les échantillons du groupe T sont positifs.

Pour l'Indole ; 5 échantillons du groupe S sont négatifs, et 2 sont positifs. 4 échantillons du groupe T sont négatifs, et 3 sont positifs.

Tous les échantillons sont négatifs pour ce test, ce qui indique une absence d'activité catalase dans ces bactéries de la flore orale.

**Synthèse :**

Nous avons noté que le profil biochimique des souches de la flore commensales saines (S01-S07) et quelques souches de la flore commensales tumorales (T04 et T05) est semblable dans les trois flores ce qui suggère que les bactéries anaérobies peuvent exister dans les lieux cités en dessus. Tandis que le profil biochimique des souches des flores commensales des animaux malades diffère.

On remarque que le profil biochimique des souches (T01, T03 et T06) se ressemble entre la flore intestinale et orale, or que le profil biochimique des souches (T02 et T07) de la flore commensale intestinale et mammaire se ressemblent plus que ceux de la flore commensale orale.

### II.3. Identification bactérienne

Grâce aux résultats de coloration de Gram et des galeries API effectué précédemment, nous avons pu avoir une identification préliminaire des genres bactériens existant chez chaque animale à partir des prélèvements buccaux, intestinaux et mammaires, comme le montre le tableau suivant

Tableau 16 Identification des principales espèces isolées à partir des prélèvements buccaux, mammaires et intestinaux.

	Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies
S01	<i>E. Coli ; Lactobacillus ; Entérobacter Cloacae ; S.aureus ; Lactobacillus</i>	<i>Clostridium, Fusobacterium et Bactéroïdes spp</i>
S02	<i>S.aureus ; Streptococcus spp ; E. coli</i>	<i>Fusobacterium spp</i>
S03	<i>E. coli ; S. aureus ; Citrobacter Youngae ; Lactobacillus</i>	<i>Bacteroides spp</i>
S04	<i>E. coli ; S. aureus</i>	<i>Clostridium, Bacteroides spp</i>
S05	<i>E. coli ; S. aureus ; Lactobacillus</i>	<i>Clostridium, Fusobacterium et Bacteroides spp</i>
S06	<i>E. coli ; S. aureus ; Streptococcus spp ; Lactobacillus</i>	<i>Fusobacterium, Bacteroides spp</i>
S07	<i>E. coli ; S. aureus ; Lactobacillus ;</i>	<i>Bactéroïdes spp</i>
T01	<i>E. coli ; S. aureus ; Lactobacillus ; Serratia ficaria</i>	<i>Clostridium, Actinomyces , Fusobacterium et Bacteroides spp</i>
T02	<i>E. coli ; S. aureus ; Streptococcus spp ; Salmonella ; Entérobacter sakazakii</i>	<i>Clostridium, Fusobacterium et Bacteroides spp</i>
T03	<i>E. coli ; Entérobacter sakazakii et cloacae ; Lactobacillus ;</i>	<i>Clostridium, Actinomyces, Fusobacterium et Bacteroides spp</i>
T04	<i>E. coli ; S. aureus ; Lactobacillus ; Citrobacter freundii</i>	<i>Clostridium, Fusobacterium et Bacteroides spp</i>
T05	<i>E. coli ; S. aureus ; Streptococcus spp ; Salmonella spp</i>	<i>Clostridium, Actinomyces, Fusobacterium et Bacteroides spp</i>
T06	<i>E. coli ; S. aureus ; Lactobacillus ; Streptococcus ; Serratia odorifera 1</i>	<i>Clostridium, Fusobacterium et Bacteroides spp</i>
T07	<i>E. coli ; S. aureus ; Lactobacillus ; Entérobacter cloacae</i>	<i>Clostridium, Actinomyces , Fusobacterium et Bacteroides spp</i>

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Nous avons remarqué qu'il n'y a pas une différence importante entre les souches bactériennes présente chez les individus malades (avec tumeur) et ceux des individus sains, mise à part qu'il existe au niveau mammaire certaines souches exclusivement digestive.

Cela nous a poussé à effectuer une étude comparative quantitative entre la flore bactérienne des animaux sains et tumoraux.

#### II.4. Dénombrement

Le tableau 17 regroupe les résultats de dénombrement obtenu sur la gélose ISA à partir des trois flores anaérobies étudiées

*Tableau 17 Dénombrement sur gélose ISA de la flore anéorobie*

	Dénombrement sur gélose ISA (UFC)
S01	248
S02	78
S03	123
S04	142
S05	269
S06	99
S07	52
T01	679
T02	923
T03	1228
T04	521
T05	808
T06	1474
T07	430

Source : Tableau personnel élaboré par BENZEID.N, ENSV 2024.

Les souches de la série T (T01 à T07) montrent un nombre plus élevé de colonies que les souches de la série S (S01 à S07).

Parmi les souches S, S05 présente le plus grand nombre de colonies (269), tandis que S07 en présente le moins (52). En revanche, parmi les souches T, T06 a le plus grand nombre de colonies (1474), tandis que T07 en a le moins (430).

Ce résultat peut nous permettre d'affirmer une différence significative du nombre de colonies bactériennes entre les prélèvements des animaux sains et ceux des animaux présentant des néoplasies mammaires.

# CONCLUSION GENERALE

## CONCLUSION GENERALE

Les recherches menées dans le cadre de ce projet de fin d'étude sur "l'étude comparative de la flore commensale buccale, digestive et mammaire chez les carnivores domestiques sains et ceux atteints de tumeurs mammaires" mettent en lumière l'importance cruciale du microbiome pour la santé et le bien-être des chiens et des chats. La flore bactérienne commensale, composée de nombreuses espèces vivant en symbiose avec leur hôte, joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie, la protection contre les agents pathogènes et la modulation du système immunitaire.

Les résultats de cette étude montrent une association significative entre les modifications qualitatives et quantitatives de la composition du microbiome mammaire et la présence de tumeurs mammaires chez les carnivores domestiques. Ces résultats soulignent le rôle potentiel du microbiome dans le développement des tumeurs mammaires, suggérant que des altérations du microbiome pourraient influencer la pathogénèse du cancer mammaire.

### Perspectives et recommandations

Ce travail a pour perspective d'étudier le comportement des bactéries endosymbiotiques chez des carnivores domestiques atteints de tumeur et d'autres sains. Notre objectif était également de déterminer s'il existe une association entre l'apparition des cas de tumeurs mammaires et la prolifération des bactéries commensales dans la même région anatomique.

Nous recommandons pour les futures études, d'élargir l'analyse sur un plus grand nombre de cas afin que les résultats soient statistiquement plus significatifs et surtout exploitable peut être pour des fins thérapeutiques.

De plus, la mise en culture des bactéries anaérobies a été très fastidieuse et très difficile. Aussi, nous recommandons de faire la caractérisation des bactéries anaérobies et aérobies par la technique PCR qui est une technique moléculaire plus spécifique, plus sensible *a contrario* de la culture bactérienne.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Aas JA, et al. (2005).** PLoS biology, 3(7), e274.
- **ABBOTT ET AL., 2015:** "Active surveillance for multidrug-resistant Gram-negative bacteria in the intensive care unit." Pathology 47.6 (2015): 575-579.
- **Abdel-Fatah et al.,** Histopathology 2007
- **Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014).** Role of the microbiota in immunity and inflammation. Cell, 157(1), 121-141.
- **Boutaga K, et al. (2007).** FEMS microbiology letters, 273(1), 78-85.
- **Branda et al., 2020.** Vet Dermatol
- **Delalogue et al.,** Annals of Oncology 2005
- **Demmitt A., P Corley, M Huibregtse et al., 2017:** Genetic influences on the human oral microbiome, BMC Genomic, 18:659
- **Devriese et al., 2005.** Vet Microbiol
- **Dewhirst et al., 2010:** The human oral microbiome; DOI: 10.1128/JB.00542-10
- **Dewhirst FE, et al. (2010).** Applied and environmental microbiology, 76(9), 2540-2547.
- **Dewhirst FE, et al. (2012).** PloS one, 7(11), e47917.
- **Enersen M, et al. (2006).** Journal of clinical microbiology, 44(12), 4371-4378.
- **Fearon ER, Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990;61(5):759-767.
- **Fitschen, W. (2013).** Reproduction-Mammary Glands. In Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition) (pp. 323–324). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00378-X>
- **Forbes et al., 2007.** Bailey & Scott's diagnostic microbiology.
- **Gonzalez et al., 1993:** Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species; <https://doi.org/10.1139/g93-137>
- **Guardabassi et al., 2004.** J. Clin. Microbiol. 42:842-847.
- **Handl et al., 2013:** Faecal microbiota in lean and obese dogs; <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12067>
- **Herstad et al., 2020.** PLoS ONE 15(6): e0236232.
- **Holt et al., 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology.
- **Jean-Pierre Hélène., 2010 :** Laboratoire de Bactériologie CHU Montpellier (Journée nationale d'infectiologie (<https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI10/IDE/JNI2010-IDE-Jean Pierre.pdf>))
- **Jousimies-Somer et al., 2002:** Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual
- **Kawamura Y, et al. (1995).** International journal of systematic bacteriology, 45(4), 810-813.

- **Kennedy et al., 2014.** J. Clin. Microbiol. 52:4271-4275.
- **Kennedy et al., 2020.** J. Vet. Dent. 37:109-115.
- **Keravel, O. 2022 :** Questions/réponses sur les tumeurs mammaires canines et félines. Méd Chir Anim – Anim Cie 2022 ; 3-4 :54-7.
- **Koneman et al., 2006.** Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.
- **Kostic et al., 2013.** Canadian journal of veterinary research, 77(3), 217–223.
- **Lamb et al., 2015.** J Vet Intern Med.
- **Lee, 2017.** Anaerobe.
- **Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006).** Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature, 444(7122), 1022-1023.
- **Lima et al., 2015.** BMC veterinary research, 11(1), 1-10.
- **Lima et al., 2015.** BMC Veterinary Research, 11:154.
- **M Avila, DM Ojcius, Ö Yilmaz.,2009:** The oral microbiota: living with a permanent
- **MARCHAL N., BOURDON J.L., RICHARD Cl., 1982 :** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries
- **Marsh PD.,2009:** Role of the oral microflora in health, Microbial ecology in health and disease, 12:130-7
- **Mason W.J., 1951.** The properties and uses of MacConkey's medium. Journal of Clinical Pathology, vol. 4, no. 4, p. 267-279.
- **Mermel et al.,** Journal of Clinical Oncology 2011
- **Misdorp et al.,1999:** WHO classification of tumours in domestic animals.
- **Misdorp W, Hart AA., 2001:** Canine and feline mammary tumors. International Veterinary Information Service.
- **Montagna et al., 2008.** New Microbiol.
- **Nguyen et al.,** Journal of Clinical Oncology **2009**
- **Noble, P. J., & Hendrickson, D. A. (2005).** Histology and Microscopic Anatomy of Bovine and Canine Mammary Glands. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 35(3), 645–662. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2005.01.003>
- **Owen L.N.** Bovine medicine and surgery. American Veterinary Publications; **1980.**
- **Owen LN.** Bovine medicine and surgery. **2000**
- **Porter et al.,** World Journal of Surgery 1999
- **Rodrigues Hoffmann et al., 2014.** J Dairy Sci
- **Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009).** The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature reviews immunology, 9(5), 313-323.

- **Roussy G., Leroux R., Oberling CH., 1950** : Le précis d'anatomie pathologique. Edition MASSON et CIE
- **Salomon et al., Nature 2010**
- **Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., & Finlay, B. B. (2010)**. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.
- **Seo et al., 2012**. *J. Vet. Sci.* 13:363-367.
- **Simpson et al., 2018**. *Front. Vet. Sci.* 5:302.
- **Suchodolski et al., 2012**. *Vet. Microbiol.* 158:70-76.
- **Suchodolski, 2011**. *Topics in Companion Animal Medicine.* 26:154-160.
- **Suchodolski, J. S. (2016)**. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 46(1), 163-179. doi:10.1016/j.cvsm.2015.08.002
- **Swanson et al., 2002**: Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review; <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200002>
- **Tanner et al., 2015**. *MBio.* 6(3):e02427-14.
- **Teng et al., 2018**. *Front. Vet. Sci.* 5:302.
- **Thompson et al., 2017**. *J. Vet. Dent.* 34:156-163.
- **Vandepitte, J. 2003**: Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization 2003.
- **Walker R.J., (2004)** Digestive system and associated organs, In: *Veterinary microbiology*, second edition, 446-450
- **Weinberg RA.** *The Biology of Cancer.* 2nd ed. New York: Garland Science; **2013**.
- **World Health Organization,** *Classification of Tumours 2021*
- **Wyllie, A. L., & Spégel, C. W. (2020)**. Host-microbe crosstalk in the intestine: how bacterial metabolites shape the physiological response. *Journal of Biological Chemistry*, 295(2), 321-332.
- **Zhang et al., 2013**. *PLoS One.*
- **Zhang et al., 2017**. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 217.
- **Zhang et al., 2019**. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9:202.
- **ZOLINGER H., 1970** : Abrége d'anatomie pathologique, pathologie générale. Edition MASSON et CIE, 208, 209, 210