

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Spécialité : Biochimie Fondamentale



Réf :

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

MASTER

Thème

*Optimisation de l'extraction des acides
nucléiques bactériens à partir
du microbiote fécal*

Présenté par :

ISSAD Yousra & KEKOUICHE Nesrine

Soutenu le : 13/09/2022

Devant le jury composé de :

Mme Ait Ali D.

MCB

Encadrant

Mr Zaidi H.

MCB

Président

Mme Boudjouan A.

MCB

Examinatrice

Année Universitaire : 2021 / 2022

Remerciements

Avant tout nous tenon a remercié dieu tout puissant qui nous a donné la force de surmonté tous les obstacles rencontrés au cours de notre parcours pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons énormément à remercier notre enseignante «Ait Ali el Djida» qui a accepté d'encadrer notre modeste travail, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire. Pour votre bienveillance vos conseils et instruction et surtout pour nos donner du temps, malgré votre occupation intense.

Nous remercions Mr «GUIDOUCHE» pour leur aide, soutiens, et pour tous tes conseils durant ce travail.

Nous remercions M^{elle} «MEHELLEB Dalila» pour leur aide, pour nous soutenir et pour ces efforts au sein du laboratoire. Merci de nous supporter et de partager toutes les informations et connaissances que vous avez, et merci de répondre à toutes nos questions. Merci d'être avec nous depuis notre premier jour au sein du laboratoire GBC.

On tenait également à remercier MADAOUI Menad, et LAHDIRI Nassim, pour leur aide, soutien, la patience et de la confiance que vous avez nous apporter.

Nous remercions aussi l'ensemble des stagiaires fin de cycle du laboratoire GBC pour tous les moments que nous avons vécus ensemble.

Nous remercions également les membres de jury Mr Zaidi. H et Mme Boudjouan.

A pour avoir accepté de juger ce travail

Nous remercions tous les participants qui nous ont fournis les échantillons.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui nous orienté ou nous aidé de quelque que soit la manière nous vous remerciant du fond du cœur.



I. Yousra & K. Nesrine -

Dédicace

En terme de reconnaissances de leurs sacrifices et amour je dédie ce travail à:

Mon cher père:

Rien au monde ne peut exprimer tes efforts fourmis jour et nuit pour mon éducation. Merci pour votre soutien et encouragements. Je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur, Que Dieu vous protège.

Ma chère maman

Aucune dédicace, ne pourrait exprimer l'amour, l'estime que j'ai pour toi. Que Dieu la garde pour moi et soit avec elle à tout moment.

Mes frères Khaled, Yacine

Mes sœurs Nadira et Sarah

Pour leur soutien et leurs encouragements. Je dédie ce travail à ma sœur et ça famille

Mes chères grandes mères, Mes tantes et mes oncles

Pour leur amour, gentillesse et leur soutenu durant tout mon parcours.

A mon binôme et amie: NESRINE

Qui a partagé avec moi ce travail, la joie, le stress et la fatigue, et d'apprendre beaucoup de chose durant ce stage.

A mes amis: Bachir et Mazigh

Pour les beaux moments que nous avons partagés depuis le début de notre stage, pour votre aide et support durant les moments difficiles.

Au finale je dédie ce travail à Dalila, Menad et Nassim

Pour leur aide et leurs encouragements pour réaliser ce travail.

Pour tous ceux et celles qui ont de l'affection et considération à mon égard.



I. Yousra -

Dédicace

Je tiens a dédié ce travail :

A la mémoire de mon chère père K. Abdallah

*La personne avec qui J'aurais aimé de partager cette joie, je vous lui
dire je me suis réussi papa par ce que j'ai suivi tes conseils.*

*« Que Dieu lui fasse miséricorde et lui pardonne et demeure dans
son vaste paradis».*

A ma chère mère

*Celle qui m'a donnée la vie T.Djamila, quoi que j'écrive, je ne
pourrai pas exprimer ce que vous avez fait pour moi t'es une
maman parfaite. Mon amour, ma tendresse et ma reconnaissance
pour toi sont infinies. « Que Dieu te protège pour moi ».*

A mon chère oncle Dr K. Abdenour et sa femme B. Sabiha

*Pour leurs aides soutiens et encouragements. Merci d'être toujours à
mes côtés je vous aime.*

A mon chère frère Fouad et ma chère sœur Sonia

Pour leur patience et d'être à mes côtés.

A mon fiancé Youcef

*Pour son soutien et encouragement tout au long de mon parcours
universitaire.*

A mon binôme Yousra

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

A Dalila et Menad

*Pour leur soutien et de partagé avec nous leur connaissances, sans
oublier aussi Nassim.*

Au finale je dédié ce travail à toute la promotion BF 2021/2022



K.Nesrine -

Sommaire

Liste d'abréviation	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction Générale.....	1

Chapitre I

Synthèse bibliographiques

I.1. Le microbiote intestinal.....	3
I.1.1. Généralités.....	3
I.1.2. Définition.....	4
I.1.3. Localisation de différents types de microbiote.....	5
I.1.4. Relation entre le microbiote-intestin-cerveau	5
I.1.4.1. Les Voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau:	5
I.1.4.2. L'axe microbiote intestinal-cerveau:	6
I.1.4.2.1. Via l'innervation du nerf vague	7
I.1.4.2.2. Par le biais de voies inflammatoires à médiation immunitaire	8
A. L'immunité innée.....	8
B. L'immunité adaptative	9
C. Les cellules T régulatrices (Tregs).....	9
D. Les cellules TH17	9
I.2. Les tumeurs cérébrales	10
I.2.1. Gliomes.....	10
I.2.2. Les pathologies neurologiques	11
I.2.3. Sclérose en plaques.....	11
I.2.4. La maladie de Parkinson	12
I.2.5. La maladie d'Alzheimer.....	12
I.3. Techniques d'extraction de l'ADN	13
I.3.1. Extraction par des méthodes biochimiques	14
I.3.1.1. Les méthodes utilisant des solvants organiques	14
A. Les méthodes utilisant des solvants non organiques	14
B. Les méthodes basées sur l'utilisation de microcolonnes de résines échangeuses d'ions.....	14
I.3.1.2. Les méthodes utilisant des solvants organiques	14
A. Méthode au phénol-chloroforme	14

Sommaire

I.3.2. Préparation à grande échelle par CsCl d'ADN génomique bactérien:.....	14
I.3.3. Isolation d'ADN avec des billes magnétiques	15

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II.1. Matériels	17
II.1.1. Durée et lieu de stage	17
II.1.2. Population étudié.....	17
II.1.2.1. Caractérisation de la population d'étude	17
II.1.2.1.1. Répartition selon l'âge.....	17
II.1.2.1.2. Répartition selon le sexe	18
II.1.2.1.3. Echantillonnage	19
II.2. Méthodes.....	19
II.2.1. Extraction d'ADN	19
II.2.1.1. Les étapes d'extraction	19
A. Etape d'homogénéisation.....	19
B. Etape de pré-extraction:	20
C. Etape de phénol-chloroforme (étape d'extraction):	20
D. Etape de précipitation	20
E. Etape de lavage.....	21
F. Etape du lecteur (Nano drop)	21

Chapitre III

Résultats et Discussion

III.1. Résultats et discussion	23
Conclusion et Perspectives.....	30
Références Bibliographiques.....	31

Annexes

Liste d'abréviation

A: Absorbance

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique

AGCS: Système de contrôle et de guidage automatique

ARN: Acide ribonucléique

A β : Amyloïde bêta

CCK: Cholécystokinine

CD4+: Cluster de différenciation 4

CEE: Cellules Entéro-Endocrines

CH25H: Cholestérol 25 hydroxylase

CHCL3: Chloroforme

CoX2: Cyclo-oxygénase 2

CSCI: Chlorure de césium

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CuHCl: Chlorhydrate de guanidinium

DC: Cellules dendritiques

EDTA: Acide éthylène diamine tétra-acétique

Foxp3: Forkhead box P3

G+: Gramme positive

GATA3: Trans-acting T-cell-specific transcription factor

GuaSCN: Thiocyanate de guanidinium

HCl: Acide chlorhydrique

HPA: Hypothalamus hypophyse surrénale

Liste d'abréviation

- HPA:** Hypothalamus- hypophyse surrénale
- Hsv1:** Virus de l'herpes simplex de type 1
- IFN-1:** Interférons de type 1
- IgA:** Immunoglobulines A
- IL:** Interleukine
- IL-1 β :** Interleukine 1 bêta
- ILC3:** Group 3 ILC
- KCl:** Chlorure de potassium
- KH₂PO₄:** Phosphate potassium monobasique
- LPS:** Lipopolysaccharide
- MA:** Maladie d'Alzheimer
- MP:** Maladie de Parkinson
- MyD88:** Myeloid differentiation primary response 88
- Na acétate:** Acétate de sodium
- NaCl:** Chlorure de Sodium
- NaOH:** Hydroxyde de Sodium
- NF- κ B:** Nuclear factor-kappa B
- NOS:** Oxyde nitrique synthase
- PAMP:** Pathogen-associated molecular pattern
- PD-1:** Programmed cell Death 1
- PD-L1:** Programmed Death Ligand 1
- Ph:** Potentiel d'Hydrogène
- PRR:** Pattern recognition receptor

Liste d'abréviation

PYY: Peptide YY

Rnase A: Ribonucléase

ROS: Radicaux libres oxygène

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SEP: Sclérose en plaques

SNC: Système nerveux centrale

SNE: Système nerveux entérique

TCD4+: Lymphocytes CD4+

TH: Thorium

Th1: T helper 1

TNF: Tumor Necrosis Factor

Tolls: Toll like receptors

Tregs: T régulatrice

Tris-HCl: Tris chlore

Tris-HCl: Tris- acide chlorhydrique

VN: Nerf vague

5-HT: 5-Hydroxytryptamine

Liste des tableaux

Tableau I: Les résultats des patients	24
Tableau II: Les résultats des personnes saines	26
Tableau III: Comparaison entre les résultats de l'article et les résultats obtenus après l'extraction.....	29

Liste des figures

Figure 1 : Rôle du microbiote intestinal humain	4
Figure 2 : Localisation du Microbiote	5
Figure 3 : Les différentes voies de communication entre les différents systèmes.	6
Figure 4 : Les interactions entre le microbiote intestinal et le cerveau	7
Figure 5 : Répartition graphique des femmes selon leur âge	17
Figure 6 : Répartition graphique des hommes selon leur âge.....	18
Figure 7 : Répartition graphique des personnes selon le sexe.....	18
Figure 8 : Etapes de préparation de l'homogénéisation de l'échantillon	19
Figure 9 : Etapes de pré-extraction.....	20
Figure 10 : Etapes d'extraction.....	20
Figure 11 : Etapes de précipitation.....	21
Figure 12 : Photographies illustre les étapes de lavage	21
Figure 13 : Photographies illustre les étapes du lecteur	21

Introducción General

Introduction Générale

L'organisme humain est complexe car il se compose de plusieurs systèmes, notamment le système gastro-intestinal qui est constitué de différents microorganismes (les bactéries; les archées; les champignons et les virus) on parle donc de la flore intestinal « microbiote intestinal» (**Ferreiro et al., 2018**). Ces microbiotes hérités de la mère à la naissance, ont un impact potentiel sur la fonction cognitive à l'âge adulte (**Gomez et al., 2016**), et s'adaptent aux différents facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs, l'alimentation qui joue un rôle majeur et peut modifier directement ou indirectement l'environnement gastro-intestinal (**Landmana et Quévraina, 2016**).

Les microbiotes vivent en symbiose avec leur hôte, contribuent à la digestion d'aliments fibreux pas ou peu digestibles, et à la synthèse de vitamines et d'acides gras à chaînes courtes (**Sommer et Bäckhed, 2013**). Les rôles majeures des microbiotes sont: effet barrière contre les entéropathogènes; rôle dans l'activation du système immunitaire; rôle sur le métabolisme de l'hôte (**Landmana et Quévraina, 2016**).

La dysbiose est une diminution ou bien une augmentation de microbiotes (**Clavel, 2019**). Ce déséquilibre est la cause principale de certaines pathologies telles que les pathologies neurologiques (Alzheimer; Parkinson; Sclérose en plaques) et pathologies cérébrales (tumeur cérébrale) (**Descoins, 2017**), il induit également une signalisation immunitaire atypique et un déséquilibre de l'homéostasie (**Tremlett et al., 2016**).

Les microbiotes interagissent avec le cerveau à travers l'axe intestin-cerveau qui entraîne des modifications de l'état du système nerveux central (SNC) (**Sharon et al., 2016**).

Pour réaliser les différentes études sur le microbiote on utilise la matière fécale en raison de la facilité de la collecte des échantillons.

Dans le cadre de notre étude qui est sous le thème « Optimisation de l'extraction de matériel génétique bactérien à partir des microbiotes intestinales » nous cherchons à mettre au point un protocole fiable facile à utiliser et surtout moins coûteux.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. Le microbiote intestinal

I.1.1. Généralités

Le microbiote réparti tout au long de notre tractus digestif est estimé à plus de 100 mille milliards de bactéries, soit 100 fois plus que nos propres cellules humaines (Illiano *et al.*, 2020). Il est défini comme étant un organe supplémentaire intervenant dans les différentes activités physiologiques de l'organisme (Ferreiro *et al.*, 2018). Joue également un rôle spécifique dans le fonctionnement du corps tels que des fonctions métaboliques de transformation d'aliments et d'échange de nutriments, mais également des fonctions d'induction et d'éducation du système immunitaire de l'hôte (Landmana et Quévraina, 2016). Le dysfonctionnement du microbiote influe sur la probabilité de souffrir du diabète sucré, d'obésité morbide ou de troubles d'humeur (Illiano *et al.*, 2020). Ces micro-organismes sont divisés en quatre groupes bactériens qui sont: (Landmana et Quévraina, 2016).

- **Firmicutes:** Le phylum Firmicutes contient trois classes, "*Bacilli*", "*Clostridia*" et "*Erysipelotrichia*". La famille *Erysipelotrichaceae*, qui comprend des organismes Gram-positifs formant des parois. La flore présente dans l'intestin humain est composée des firmicutes.
- **Bacteroidetes (phylum Bacteroidota):** C'est un phylum composé de trois grandes classes de bactéries Gram-négatives, non sporulées, anaérobies ou aérobies et en forme de bâtonnets, largement répandues dans l'environnement, ainsi que dans les intestins et sur la peau des animaux.
- **Actinobacteria (Actinobactéries):** C'est une classe de bactéries filamenteuses, Gram-positives. Jouant un rôle important dans la décomposition des matières organiques.
- **Proteobacteria (protéobactéries) :** Sont dites Grams négatifs, elles possèdent une paroi cellulaire riche en lipopolysaccharides et pauvre en peptidoglycanes et forment un groupe de procaryotes. Elles possèdent un flagelle, ce qui leur permet de se déplacer dans le milieu (Illiano *et al.*, 2020).

Il existe trois types de flore intestinale : bactéries symbiotiques, bactéries commensales et bactéries opportunistes (Descoins, 2017).

- **Bactéries symbiotiques :** Sont des bactéries vivant en symbiose avec un autre organisme, elles sont présentes chez les animaux, par exemple au sein du système digestif où elles aident à la digestion des aliments.

- **Bactéries commensales** : Vivent au contact de l'organisme sans provoquer de troubles, et jouent un rôle fondamental dans la résistance aux infections.
- **Bactéries opportunistes** : Sont présente dans l'organisme sans l'affecter, mais cela peut entraîner des maladies une fois que les défenses de l'organisme sont réduites (Descoins, 2017).

I.1.2. Définition

Le microbiote intestinal, appelé «flore intestinale», est l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, parasites et champignons non pathogènes) qui vivent dans un environnement spécifique. Il se caractérise par un emplacement sélectif des différentes populations des bactéries tout au long du tube digestif, régulées par des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs extrinsèques comme l'alimentation et les antibiotiques interviennent dans la composition du microbiote (Rizzatti *et al.*, 2017). Ces micro-organismes jouent des rôles très important dans le bon fonctionnement du corps humain (figure1) tels que:

- Protection contre les pathogènes.
- Synthèse des vitamines.
- Participe au développement et à la maturation du système immunitaire.
- Participe à la prise de poids.
- Fermente les fibres en AGCC (acides gras à chaînes courtes).
- Module le SNC (système nerveux central).

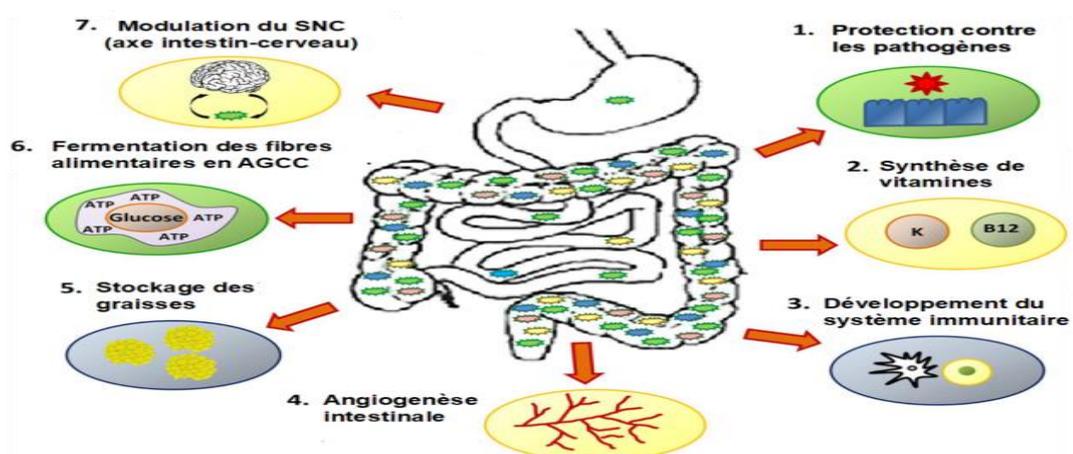


Figure 1 : Rôle du microbiote intestinal humain (Amon et Sanderson, 2017)

I.1.3. Localisation de différents types de microbiote

Le microbiote se répartit dans le tractus digestif selon la nature de milieu, dans lequel au niveau de l'estomac, se trouve les espèces du microbiote suivant (*Helicobacter pylori*, Bactéries G+, *Proteobacteria* G+, *Bacteroidetes* G+, *Actinobacteria* G+ et *Fusobacteria* G+) car il possède un milieu acidophile oxygéné, alors que dans les intestin grêle se localise les *Enterococci* et les *Lactobacille*. Ces microbiotes vivent dans un milieu à PH acide et aérobie, contrairement au microbiote qui se localise dans le colon qui possède un milieu anaérobie et PH basique (tels que les *Bacteroides*, *bofidobacter*, *Klebsiella* G+ et *lactobacillus* G +), La figure 2 illustre la localisation de différents microbiotes (Rebuffat et Zirah, 2018).

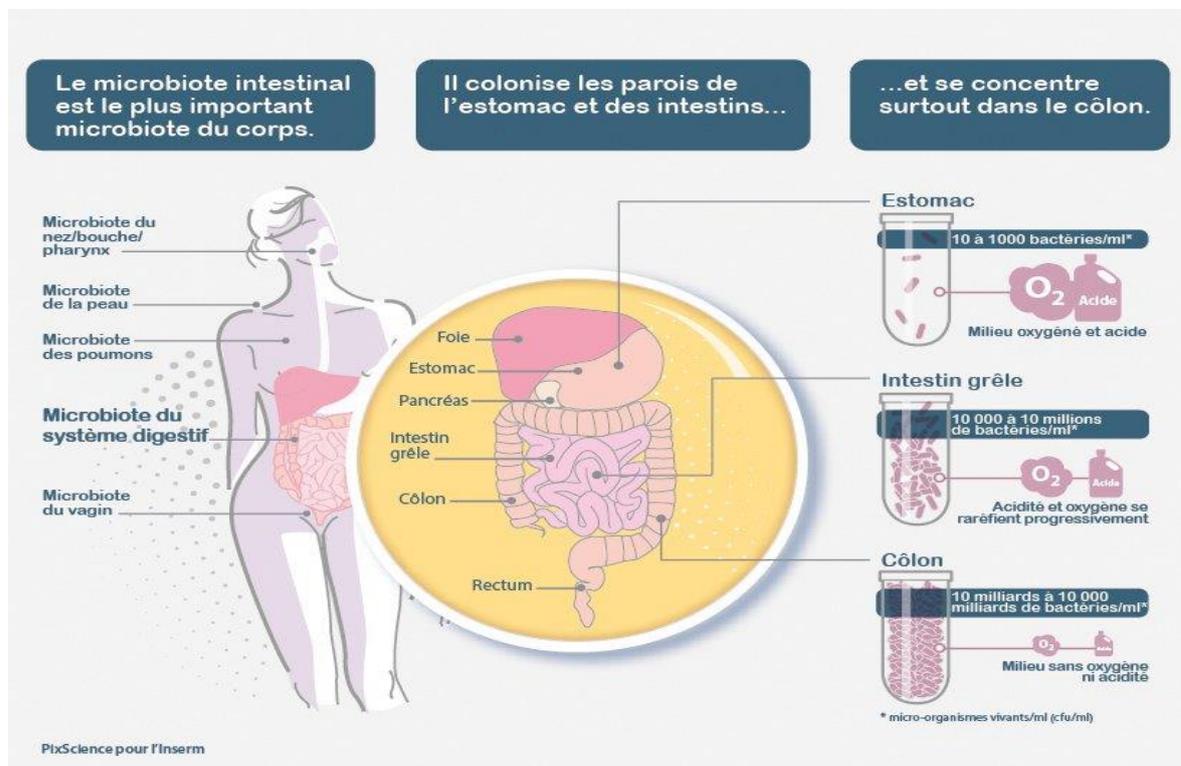


Figure 2 : Localisation du Microbiote.

I.1.4. Relation entre le microbiote-intestin-cerveau

I.1.4.1. Les Voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau

Le microbiote intestinal et le cerveau communiquent à travers quatre différentes voies :

- **Sanguine:** Les molécules libérées dans l'intestin après avoir atteint la circulation sanguine entraînant des modifications sur le fonctionnement du SNC (**Jaglin, 2013 ; Descoins, 2017**).
- **Nerveuse:** Les molécules libérées activent les récepteurs du SNE en intégrant des messages viscéraux dans les voies cérébrales (**Jaglin, 2013 ; Descoins, 2017**).
- **Immune:** Les molécules bactériennes nocives (phénol, indol, sulfide), induisent la stimulation des cellules immunitaires (**Jaglin, 2013 ; Descoins, 2017**).
- **Endocrine:** Les substances du système immunitaires libèrent des neuropeptides agissant sur le SNE (Système nerveux entérique) ou peuvent rejoindre le SNC (Système nerveux centrale) par l'utilisation de la voie systémique (**Mazzoli et Pessione, 2016**).

La figure ci-dessus illustre le lien entre le microbiote intestinal et le cerveau

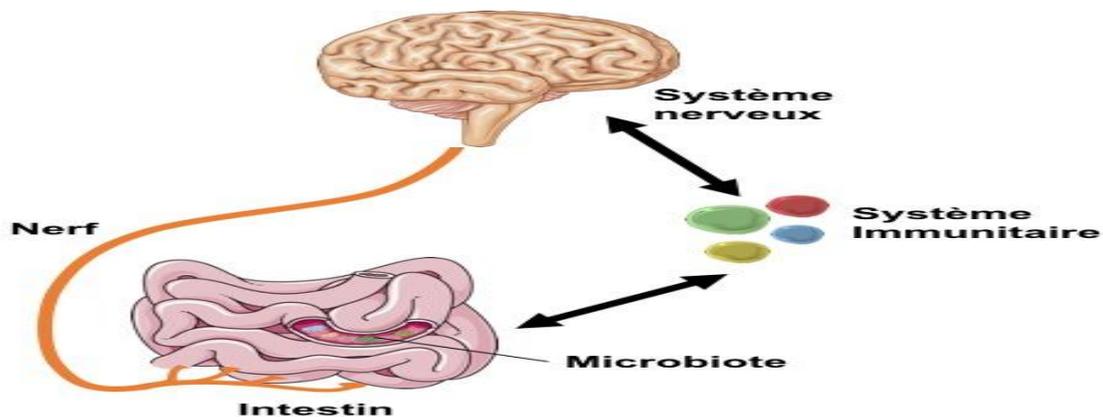


Figure 3 : Les différentes voies de communication entre les différents systèmes.

I.1.4.2. L'axe microbiote intestinal-cerveau

La figure 4 illustre les interactions entre le microbiote intestinal et le cerveau

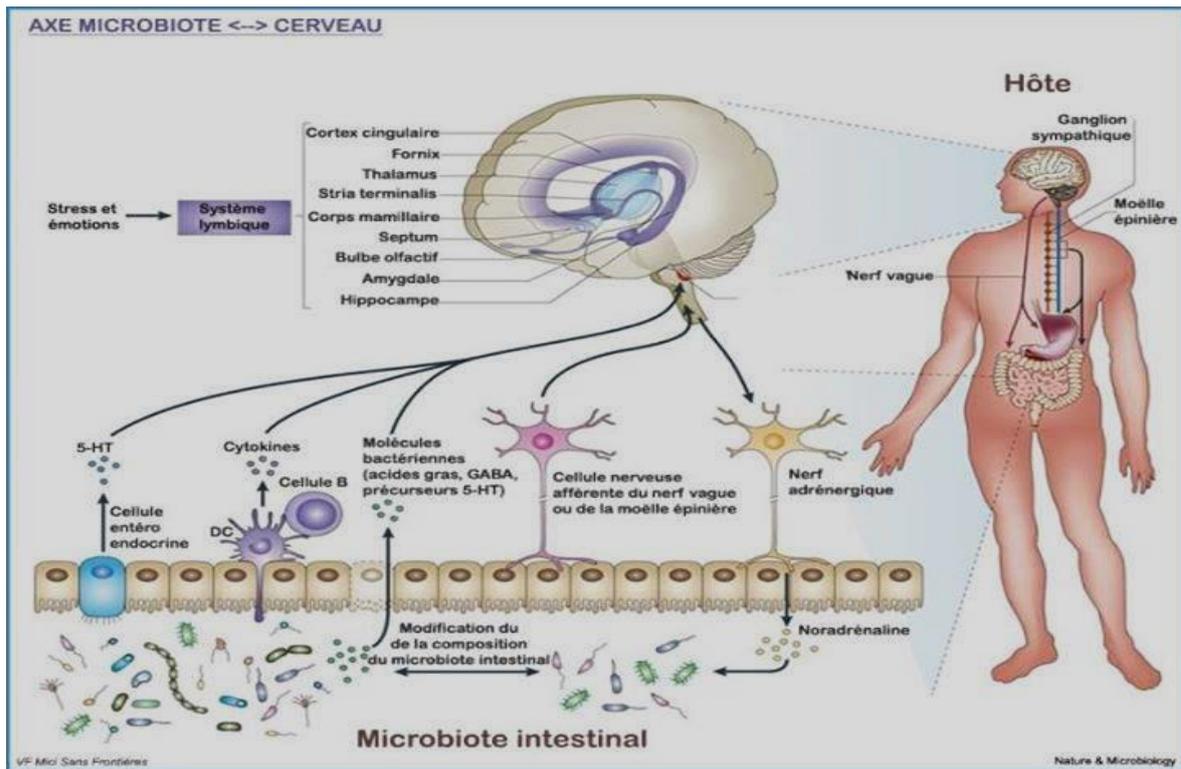


Figure 4 : Les interactions entre le microbiote intestinal et le cerveau (Crohn, 2015).

L'interaction bidirectionnelle qui présente des voies de communication (sympathique et parasympathique), entre le microbiote intestinal et le système nerveux forme ce qu'on appelle l'axe microbiote intestinale-cerveau. Ces interactions peuvent se produire par deux différentes voies soit directement via l'innervation du nerf vague, ou bien à travers les voies inflammatoires à médiation immunitaire (Gaman et Kuo, 2008).

I.1.4.2.1. Via l'innervation du nerf vague

Le nerf vague (VN) est un composant du système nerveux parasympathique et une voie clé de la communication neuronale entre le SNC et le microbiote intestinal (Bravo *et al.*, 2011). Il permet de maintenir à la fois l'homéostasie dans le cerveau et dans l'intestin. Les perturbations peuvent provoquer un dysfonctionnement du SNC (Système nerveux centrale) (troubles de l'humeur, maladies neurodégénératives) ou bien des pathologies gastro-intestinales (maladies intestinales inflammatoires, syndrome du côlon irritable) (Bonaz *et al.*, 2017).

Les fibres efférentes vagales régulent les réponses aux conditions environnementales ou pathophysiologiques dans le système gastro-intestinal via la libération de neurotransmetteurs (Browning *et al.*, 2006). Une activation inappropriée mineure du VN

entraîne une activation excessive et une élévation des neurotransmetteurs, ce qui touche au processus digestif et influence la motilité gastrique (Liu *et al.*, 2008). Les microbiotes s'appuient sur d'autres types de cellules situées dans l'épithélium pour transmettre les signaux physiologiques de l'intestin au cerveau (Ferreiro *et al.*, 2018). Les cellules entéroendocrines (EEC) sont un sous-type de cellules épithéliales (Mawe *et al.*, 2013). Elles communiquent avec le microbiote intestinal pour envoyer des signaux de sortie sous forme d'hormones telles que la 5-hydroxytryptamine (5-HT), la cholécystokinine (CCK) et le peptide YY (PYY) aux neurones afférents (Bellono *et al.*, 2017). Les EECs sont stimulées par les métabolites bactériens via les TLRs (Toll like receptors) exprimés à la surface des EECs (Plovier *et al.*, 2017). Ces médiateurs hormonaux sont impliqués dans l'activation supplémentaire des fibres afférentes neuronales en se liant aux récepteurs TLR. En outre, une étude a révélé que la transduction du signal de l'intestin peut être complétée par des interactions directes avec les fibres afférentes vagues dans une zone spécifique. Le traçage monosynaptique a révélé une synapse fonctionnelle entre des CEE spécifiques avec des neurones nodaux vagues, reliant ainsi la lumière intestinale avec le SNC et le neurotransmetteur glutamate (à l'intérieur de cette synapse) qui transmet les signaux aux neurones vagues et complète le circuit neuroépithéliale (Qianquan *et al.*, 2019).

I.1.4.2.2. Par le biais de voies inflammatoires à médiation immunitaire

L'immunité innée et l'immunité adaptative jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement du tractus gastro-intestinal humain par le maintien de l'homéostasie hôte-pathogène en tolérant les antigènes commensaux (Arrieta, 2012).

A. L'immunité innée

C'est la première ligne de défense immunitaire contre les agents pathogènes de façon immédiate, agit peu importe le type de maladie. Les composants de l'immunité innée peuvent être classés en trois types : physico-chimique, phagocytaires et inflammatoires.

Les interactions entre le microbiote et le système immunitaire se produisent principalement dans l'hippocampe. La neurogenèse hippocampique est contrôlée par la stimulation des récepteurs TLR (*toll-like receptors*) (Rolls, 2007).

Les PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*) sont des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes interagissant constamment avec les PRR (récepteurs de reconnaissance des motifs du système immunitaire inné de l'hôte) des cellules épithéliales

intestinales, des cellules immunitaires du sang périphérique et même des cellules du SNC (Janeway, 1989)

La dysbiose du microbiote déclencherait des dysfonctionnements de la barrière intestinale, tels que des modifications des jonctions serrées, des couches muqueuses et de la sécrétion d'immunoglobuline A et de lymphocytes intra-épithéliaux (Wells, 2017).

B. L'immunité adaptative

Elle joue un rôle essentiel dans les fonctions anti-infectieuses et dans le maintien de l'homéostasie microbiote-hôte pour éviter une réaction excessive à des antigènes inoffensifs. Ce fonctionnement est assuré par les cellules T régulatrices (Tregs) qui jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie immunitaire et les TH17 de la *lamina propria* intestinale.

C. Les cellules T régulatrices (Tregs)

Les signaux immunosuppresseurs protecteurs sont délivrés par l'expression de GATA3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor), Foxp3 (Forkhead box P3) et IL-33 (Interleukine) dans les cellules T régulatrices. Les AGCS (Système de contrôle et de guidage automatique) issus des fibres alimentaires sont produits par les espèces de Clostridia, contribuant notamment à l'activation et à l'expansion des cellules Treg CD4⁺Foxp3⁺ (Smith, 2013).

D. Les cellules TH17

Activées par le microbiote intestinal caractérisées par la sécrétion d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22 sont responsables de la sécrétion d'IgA de haute affinité, de la différenciation des cellules T CD4⁺ mémoire et de la fonction anti-*Staphylococcus aureus* (Hirota, 2013).

La dysbiose des bactéries intestinales active les lymphocytes T et B et influe sur la sécrétion et le changement de classe des IgA dans les lymphocytes B, la différenciation des cellules TH17 et le recrutement des cellules dendritiques, des cellules lymphoïdes innées du groupe 3 (ILC3) et des granulocytes (Honda, 2016). La surexpression de l'IL-23 induit les cellules TH17. Ces dernières sont susceptibles d'être associées à certaines maladies telles que les maladies auto-immunes, notamment l'uvéite (maladie de la cornée) et l'encéphalomyélite (Horai, 2015).

II- Pathologies cérébrales

Le microbiote influence sur le fonctionnement du SNC par le biais de diverses voies immunologiques (telles que l'inflammasome, l'IFN-I, et NF- κ B 'Nuclear factor-kappa B'), il est raisonnable de considérer sa contribution dans la progression de divers troubles neurologiques. Ici, nous discutons de l'implication du microbiote dans la neuroinflammation ou les pathologies neurodégénératives et des approches thérapeutiques potentielles pour le traitement de diverses maladies.

I.2. Les tumeurs cérébrales

Une tumeur cérébrale est une croissance cellulaire dans le cerveau, appelé aussi tumeur de système nerveux central (SNC), qui peut être de nature bénigne (non cancéreuse) ou maligne (cancéreuse). Elle peut être d'origine cérébrale ou avoir envahi le cerveau après s'être développée dans une autre région de l'organisme (métastase) (Bencokova, 2007; Armstrong *et al.*, 2010).

I.2.1. Gliomes

Les gliomes ou tumeurs gliales sont l'ensemble des tumeurs cérébrales. Le glioblastome est l'une des tumeurs les plus malignes avec des taux de mortalité alarmant (Davis et Glioblastoma, 2016).

Des études récentes démontrent le rôle potentiel du microbiote dans l'immuno-oncologie en mettant l'accent sur les points de contrôle immunitaire.

Le microbiote commensal joue un rôle thérapeutique dans plusieurs types de tumeurs. Les bactéries *Bifidobacterium* ont une action antitumorale en coopérant avec le système immunitaire inné et le blocage de **PD-L1** (*Programmed Death Ligand 1*) des protéines clefs dans le contrôle de la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet PD-L1 agit en se liant à des récepteurs appelés PD-1 et B7.1 situés sur les cellules T. La liaison de PD-L1 à l'un de ces récepteurs entraîne l'inactivation des lymphocytes T. Ainsi, cette liaison entre PD-L1 et son récepteur constitue une cible thérapeutique intéressante en immuno-oncologie. En fait, le blocage de la protéine PD-L1 empêche les cellules cancéreuses d'inactiver les lymphocytes T via les récepteurs PD-1 et B7.1. Ainsi, les

lymphocytes T retrouvent leur rôle de détection et de destruction des cellules cancéreuses (**Ruisseaux et al., 2017**).

De même, lors de l'analyse des échantillons des selles de patients atteints de mélanome métastatique, *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens* et *Enterococcus faecium* ont une abondance accrue chez les sujets qui ont répondu à une inhibition de PD-1 avec des anticorps thérapeutiques, ce qui suggère que certains microorganismes sont en train de développer des anticorps thérapeutiques, donc que certains taxons microbiens dans l'intestin pourraient jouer un rôle de soutien pour renforcer les effets du blocage de PD-1.

La présence d'espèces bactériennes clés, *Enterococcus* et *Barnesiella*, est à la fois nécessaire et suffisante pour déclencher des réponses immunitaires efficaces telles que l'induction de réponses Th1 mémoire et de réponses Th17 pathogènes, ainsi que l'augmentation des cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques de la tumeur. (**Ferreiro et al., 2018**).

I.2.2. Les pathologies neurologiques

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par la destruction progressive de certains neurones.

Elles regroupent plusieurs pathologies : maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson et la sclérose en plaques

I.2.3. Sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire caractérisée par la démyélinisation à médiation immunitaire des axones neuronaux. La perte de myéline entraîne, à des degrés divers des troubles neurologiques distincts, notamment moteurs, sensoriels, visuels, autonomes et cognitifs (**Hemmer et al., 2002**).

Des réponses immunitaires anormales liées aux cellules T CD4+, notamment la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par des cellules Th1 et Th17 hyperactives, conduisent à l'infiltration de la myéline et de diverses cellules immunitaires dans le SNC (**Fletcher et al., 2010**).

Les faibles activités immunosuppressives des Tregs chez les patients atteints de SEP peuvent aussi aggraver la réaction auto-immune (**Viglietta et al., 2004**).

Le microbiote intestinal régule à la fois la signalisation immunitaire innée et certains processus physiologiques du SNC qui régule la pathogénèse de SEP (Berer *et al.*, 2011).

I.2.4. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative courante est caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra*, accompagnée de l'accumulation d' α -synucléine (Schneider *et al.*, 2017). Cette maladie présente des symptômes moteurs multifactoriels, des tremblements, une rigidité musculaire, une lenteur des mouvements et des anomalies de la motilité (Svein *et al.*, 2016). Des facteurs génétiques et environnementaux complexes sont impliqués dans l'initiation et le développement de la MP (Samii *et al.*, 2004).

L' α -synucléinopathie est une pathologie initiée dans le SNE avant de se manifester dans le SNC au cours de stade précoce de la maladie de PK (Bouvier *et al.*, 2009). Au cours de ce processus, l'accumulation d' α -synucléine sauvage provoque une altération de la fonction motrice du côlon (Wang *et al.*, 2008).

L'expression des TLR contribue à l'inflammation et à la neurodégénérescence dans la MP. L'interaction entre le TLR4 et l' α -synucléine déclenche des réactions microgliales, la production de cytokines pro-inflammatoires et favorise le stress oxydatif. Alors que l'association de TLR2 et l' α -synucléine favorise la production de signaux neurotoxique (MyD88 et NF-KB), induisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires.

L'interconnexion cohérente entre le métabolisme microbien et les TLRs induit une inflammation locale élevée et un dysfonctionnement dans la clairance des dépôts d' α -synucléine, qui contribuent de manière synergique à la neurodégénérescence de la MP (Ferreiro *et al.*, 2018).

I.2.5. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative chronique et irréversible et la forme la plus courante chez les personnes âgées (Wimo *et al.*, 2016). Cette maladie se caractérise par une perte de neurones et des altérations progressives de la fonction synaptique, accompagnée d'un dépôt de peptide amyloïde- β ($A\beta$) à l'extérieur ou autour des neurones ainsi qu'une accumulation de protéines hyperphosphorylées à

l'intérieur des neurones corticaux (**Tiraboschi et al., 2004**). Le dépôt élevé d'A β entraîne la libération de divers médiateurs pro-inflammatoires par la microglie, y compris iNOS, ROS, COX2 et NF- κ B, provoquant ainsi une neuroinflammation dans la pathogenèse de la MA (**Qianquan et al., 2019**). La surcharge en A β et l'agrégation de tau favorisent la déstabilisation des microtubules, la déficience synaptique, la perturbation de l'homéostasie du Ca²⁺ dans les neurones, et finalement l'apoptose neuronale (**Yankner et al., 1990**).

La MA présente de graves dysfonctionnements du SNC (l'apprentissage de la mémoire et du comportement), ce qui entraîne un handicap des activités quotidiennes.

La MA est associée à une origine infectieuse périphérique, qui peut provoquer une neuroinflammation dans le SNC (**Ferreiro et al., 2018**). Les caractéristiques du dépôt d'A β et de tau dans la MA sont directement liées à l'infection par le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV1) chez la souris. L'infection virale augmente sélectivement l'expression du gène codant le cholestérol 25-hydroxylase (CH25H) qui est essentiel à la modulation de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson (**Papassotiropoulos et al., 2005**).

Des études récentes ont démontré que des espèces spécifiques du microbiote intestinal activent les voies de signalisation A β et contribuent à la pathogenèse de la MA, impliquant le microbiote intestinal comme un facteur vital dans l'étiologie de la MA. Ces études, ont permis de détecter des molécules métaboliques du microbiote dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la MA associées à des biomarqueurs de MA (tau phosphorylée et tau/A β 42 phosphorylée), indiquant ainsi l'implication du microbiote intestinal dans la pathogenèse de la MA (**Ferreiro et al., 2018**).

I.3. Techniques d'extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) est une technique permettant d'isoler l'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules ou des tissus. L'extraction d'ADN est considérée comme étant la première étape dans la plupart des études de biologie moléculaire.

Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement les mêmes étapes et principe qui sont:

- **Lyse cellulaire** : par des méthodes physiques (ex. : broyage ou lyse hypotonique), des méthodes chimique (ex: lyse détergente, agents chaotropiques, réduction des thiols) et la digestion enzymatique (ex: protéinase K).

- **Élimination des lipides** : se fait à l'aide de détergents comme le sodium dodecyl sulfate (SDS) et par centrifugation.
- **Élimination des protéines** : cette étape s'effectue à l'aide d'une protéase telle que la protéinase K.
- **Élimination de l'ARN** : l'ARN (Acide ribonucléique) est éliminé par la RNase
- **précipitation/agrégation/élution de l'ADN** : la molécule d'ADN est précipitée par l'ajout d'alcool absolu permettant la formation d'une pelote blanchâtre.

Parmi ces différentes techniques d'extraction nous avons :

I.3.1. Extraction par des méthodes biochimiques

Il existe 3 méthodes biochimiques qui ont des principes différents nous citons:

I.3.1.1. Les méthodes utilisant des solvants organiques

Méthode au phénol-chloroforme; méthode au chlorure de guanidium.

A. Les méthodes utilisant des solvants non organiques

(Exemple: méthodes basées sur l'utilisation de colonnes résines échangeuses d'ions): dans ces méthodes, le principe consiste à traiter uniquement le lysat cellulaire par une solution saline, dont l'objectif est d'éliminer par précipitation sélective les protéines.

B. Les méthodes basées sur l'utilisation de microcolonnes de résines échangeuses d'ions

Ces méthodes sont basées sur la propriété qu'ont les particules de silice d'adsorber sélectivement les acides nucléiques (**Bienvenu et al., 1999**).

I.3.1.2. Les méthodes utilisant des solvants organiques

A. Méthode au phénol-chloroforme

Le principe de cette méthode consiste à traiter le lysat cellulaire dans un premier temps par du phénol volume à volume, puis centrifugation (3 000 g, 10 min) il faut éliminer la phase phénolique, par un mélange chloroforme-alcool isoamylique (24:1). L'objectif est d'éliminer les traces éventuelles de phénol qui auraient pu être emportées avec la phase aqueuse et qui sont fortement inhibitrices des réactions enzymatiques. Le phénol est équilibré à pH 8,0 saturé en eau, dégazé avec ou sans agent antioxydant (8-hydrox quinoléine). Le traitement au phénol chloroforme (CHCl₃ et Isoamyl-OH ; puissant

agent déprotéinisant) permet de dénaturer les protéines, car non miscible à l'eau et de densité supérieure à cette dernière. Les acides nucléiques sont pas solubles et restent dans le surnageant aqueux (Johns *et al.*, 1989).

I.3.2. Préparation à grande échelle par CsCl d'ADN génomique bactérien

Ceci est une technique utilisée pour avoir une énorme quantité d'ADN génomique exceptionnellement pure en particulier dans le cadre d'études de l'ADN génomique.

Elle implique la purification d'ADN génomique sur un gradient de chlorure de césium à grande échelle (Aruna, 2021).

I.3.3. Isolation d'ADN avec des billes magnétiques

Une méthode rapide d'isolation d'ADN, dont le principe de base est le suivant : l'ADN est initialement lié aux billes magnétiques et celles-ci sont séparées de la solution rapidement à l'aide d'une barre de séparation magnétique. Dans l'étape suivante, l'ADN est élué avec un tampon d'éluion approprié et les billes magnétiques sont séparées à l'aide du même procédé précédent.

Le principe de base de ce protocole repose sur les propriétés de lyse et d'inactivation de la nucléase de deux protéines de lyse et d'inactivation des nucléases de deux agents chaotropes, considérés comme le chlorhydrate de guanidinium (GuHCl) et le thiocyanate de guanidinium (GuaSCN). Ces agents sont utilisés conjointement avec l'utilisation de billes magnétiques comme matrice d'affinité (Aruna, 2021).

Chapitre II
Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Durée et lieu de stage

Ce travail expérimental relatif à ce mémoire a été réalisé au niveau du laboratoire de génie biologique des cancers de la faculté de médecine, campus Aboudaou de l'université A.MIRA de Bejaïa.

II.1.2. Population étudié

L'étude a été menée sur une population de patients atteints des maladies neurodégénératives et de tumeurs cérébrales et populations en bonne santé. Chaque patient est accompagné d'une fiche technique détaillée (Annexe 4) qui comprend toutes les informations techniques : code patient, âge, sexe, raison d'hospitalisation, prise de médicaments anti-inflammatoires ou d'autres molécules, traitement.

II.1.2.1. Caractérisation de la population d'étude

II.1.2.1.1. Répartition selon l'âge

L'histogramme ci-dessous (figure 5) présente le nombre des femmes en fonction de leur âge.

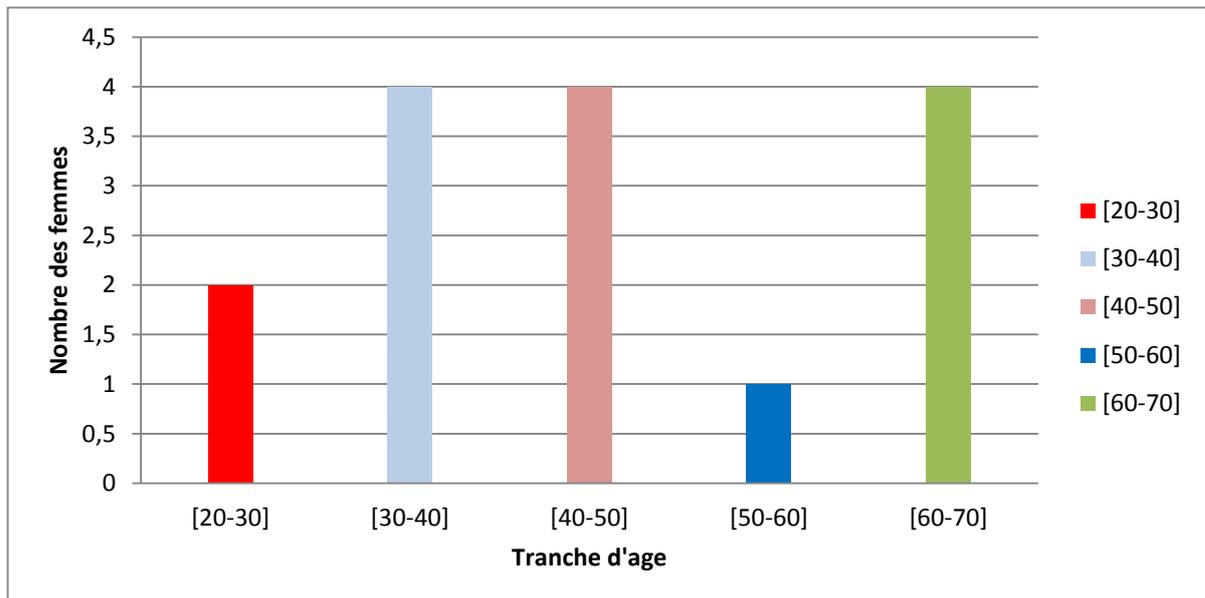


Figure 5 : Répartition graphique des femmes selon leur âge

L’histogramme ci-dessous (figure 6) présente le nombre des hommes en fonction de leur âge

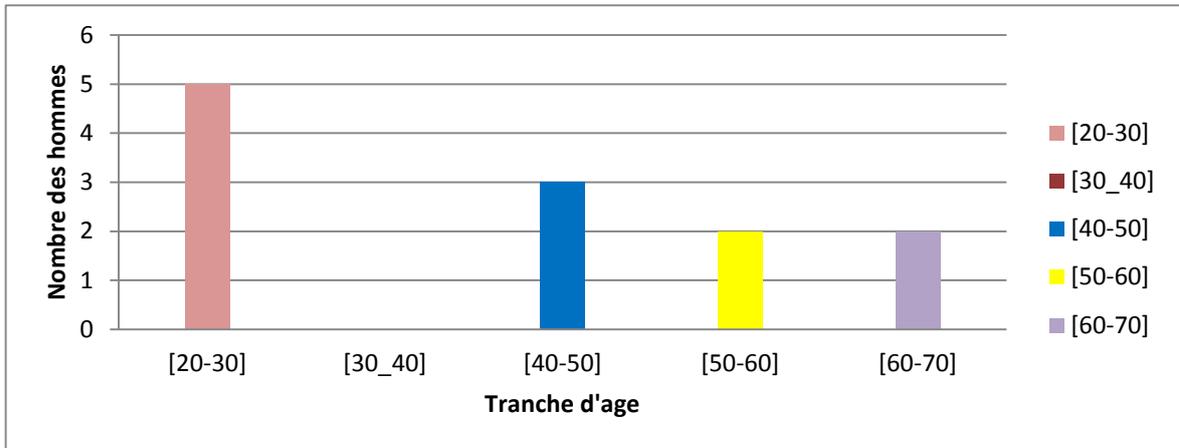


Figure 6 : Répartition graphique des hommes selon leur âge

II.1.2.1.2. Répartition selon le sexe

Diagramme circulaire présente le pourcentage des femmes et des hommes. Sur les 27 personnes, nous avons 12 hommes (6 patients et 6 personnes saines) et nous avons 15 femmes (6 patientes et 9 saines) (figure 7).

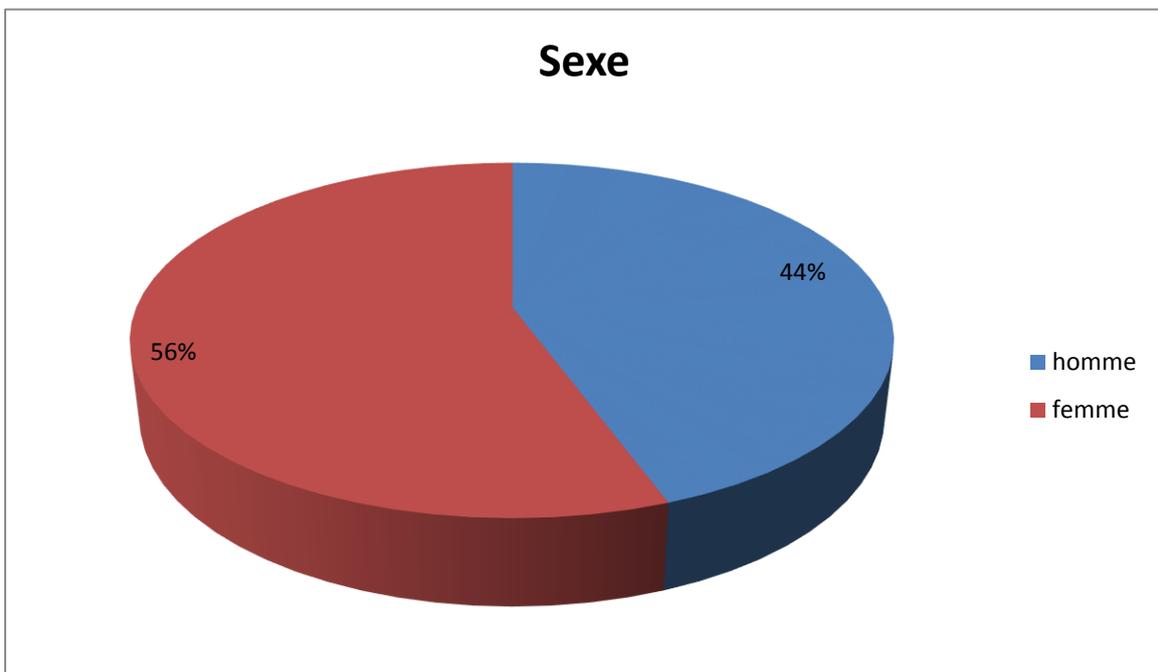


Figure 7 : Répartition graphique des personnes selon le sexe

II.1.2.1.3. Echantillonnage

Les échantillons sont récupérés au moment des toilettes matinaux des patients. Les échantillons sont stockés et préservés dans des pots de coprocultures. Après avoir mentionné la date et le lieu de la récolte, les échantillons sont conservés à 4° C. Une quantité de 5g de chaque échantillon est conservé dans des tubes falcons à -20°C jusqu'au moment d'effectuer une analyse d'extraction.

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction d'ADN

Le protocole utilisées dans ce travail c'est une modification d'une méthode décrite par (Gaur *et al.*, 2019), afin d'obtenir des meilleurs résultats. Le matériel, enzymes et réactifs utilisées sont décrits dans l'annexe 1 et l'annexe 2.

II.2.1.1. Les étapes d'extraction

A. Etape d'homogénéisation

D'abord pour faire l'extraction d'ADN nous avons pesé une quantité de 100mg de la matière fécale dans un eppendorf de 2 ml, puis nous avons ajouté 1 ml de tampon d'homogénéisation, Après avoir vortexer afin de mélanger complètement l'échantillon avec le tampon, nous avons récupéré 750 µl dans un nouveau tube eppendorf puis nous avons ajouté 10µl de lysozyme.

A la fin de cette étape nous avons incubés l'eppendorf dans un thermomixer (ThermoMixer C d'Eppendorf) avec une légère agitation (350 rpm), à 60 C pendant 1 heure.

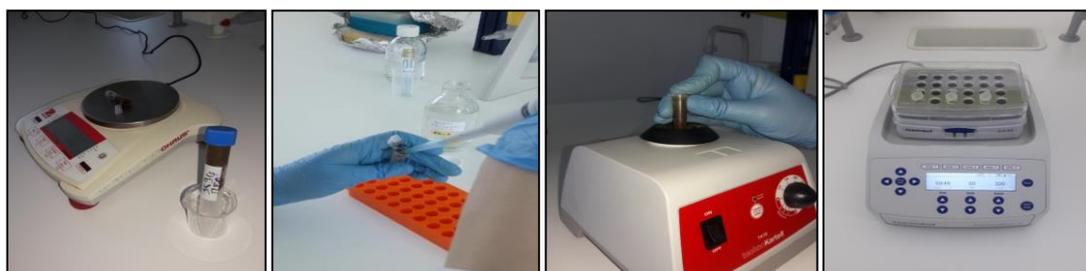


Figure 8 : Etapes de préparation de l'homogénéisation de l'échantillon.

(Photographies originales)

B. Etape de pré-extraction

Pour cette étape nous avons ajouté 10 μ l de RNase (1U/ μ l), ensuite nous avons incubé à 37°C pendant 30 min, après nous avons ajouté 10 μ l de protéinase K (20 mg/mL) et 100 μ l de SDS (10% p/v) successivement puis nous avons incubé à 60°C pendant 1 h (avec une légère agitation) (300rpm).



Figure 9 : Etapes de pré-extraction (Photographies originales)

C. Etape de phénol-chloroforme (étape d'extraction)

Nous avons ajouté un volume égal de phénol chloroforme (25:25), puis centrifuger à 8000g pendant 15 min, après nous avons récupéré le surnageant et transférer dans un nouveau tube de microcentrifugation.



Figure 10 : Etapes d'extraction. (Photographies originales)

D. Etape de précipitation

Nous avons ajouté 1/10 de volume d'acétate de sodium et un volume égal (ou volume de la solution) de l'éthanol pure (96%), suivi d'une précipitation à - 80°C pendant 20 min, puis nous avons centrifugé à 8000 g pendant 15 min pour obtenir l'ADN extrait sous forme de culot.

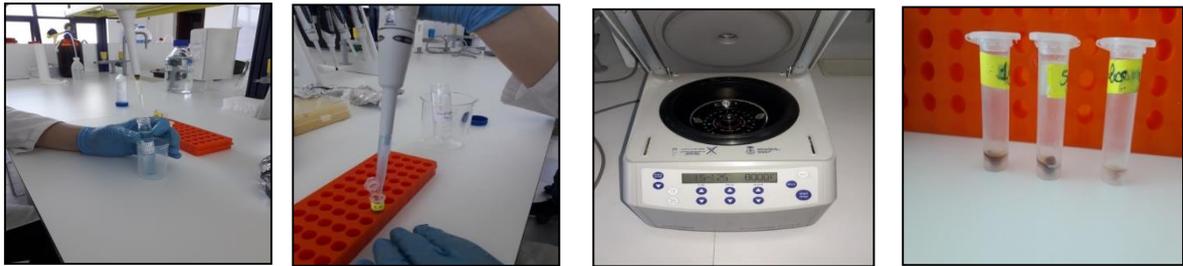


Figure 11 : Etapes de précipitation (*Photographies originales*)

E. Etape de lavage

Dans cette étape nous avons lavé 4 fois avec l'éthanol froid à 70%, ensuite nous avons centrifugé à 8000g pendant 5 min, à la fin nous avons séché les parois de l'épendorf à l'aide d'un convient ou bien coton tige.



Figure 12 : Photographies illustre les étapes de lavage. (*Photographies originales*).

F. Etape du la lecteur (Nano drop)

Nous avons ajouté 50 μ l de l'eau RNase DNase free, puis nous avons passé à la lecteur de l'absorbance d'ADN à l'aide de nano drop.

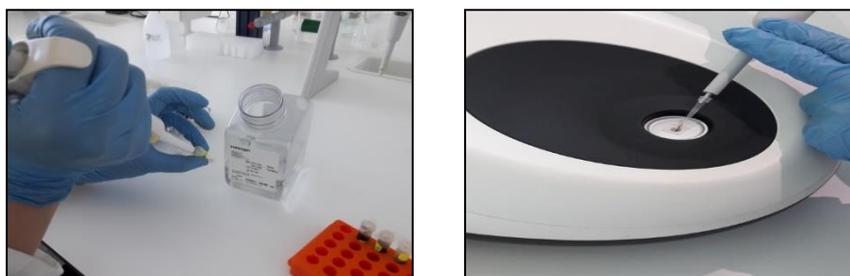


Figure 13 : Photographies qui illustrent les étapes de lecteur (*Photographies originales*).

Chapitre III

Résultats et Discussion

III.1. Résultats et discussion

Dans le but de réaliser une extraction d'ADN (matériel génomique) du microbiote intestinale nous avons utilisé un protocole chimique extrait de l'article "*Comparison of DNA Extraction Methods for Optimal Recovery of Metagenomic DNA from Human and Environmental Samples*" (Gaur *et al.*, 2019), durant notre manipulation nous avons croisé pas mal d'obstacle qui nous ont conduit à des mauvais résultats, de ce fait une optimisation est réalisée dans le but d'obtenir des meilleurs résultats.

Les résultats de l'extraction d'ADN que nous avons obtenus sont effectués par le Nano Drop, qui est un spectrophotomètre UV-visible, développé pour l'analyse de micro-volumes d'acides nucléiques purifiés. Il affiche dans ces résultats l'Absorbance 260, ratios A260nm/A280nm, ratios A260nm/A230nm et concentration. Dans le quelle

A260 : La longueur d'onde d'absorbance maximal des acides nucléiques.

Ratio A260nm/A280nm: Il est utilisé le plus souvent pour déterminer la contamination des acides nucléiques par des protéines ses valeurs sont comprise entre 1,8 et 2,0 pour l'ADN et 2,0 et 2,2 pour l'ARN. Lorsque le rapport d'absorbance 260/280 est inférieur à 1,8, cela indique la présence d'une contamination par des protéines.

Ratio A260nm/A230nm : C'est un deuxième indicateur de pureté, allant de 2,0 et 2,2 pour l'ADN. Si le ratio est faible ceci indique la présence d'une contamination par des composants organiques absorbant à 230.

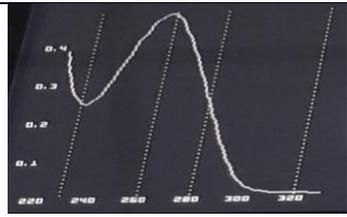
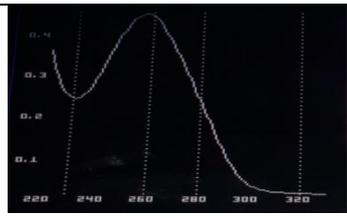
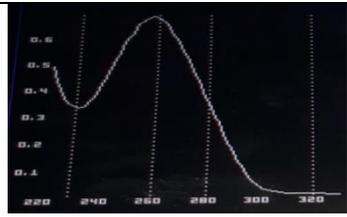
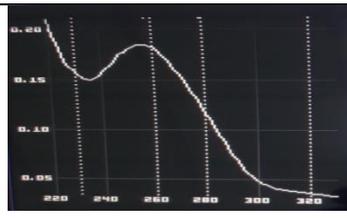
Concentration : C'est le rapport de la quantité d'ADN et le volume du milieu qu'elle occupe (L'eau Rnase Dnase free).

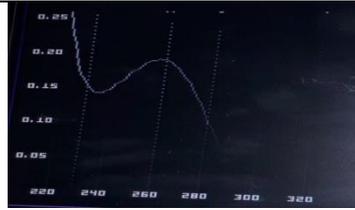
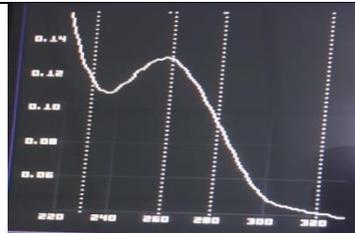
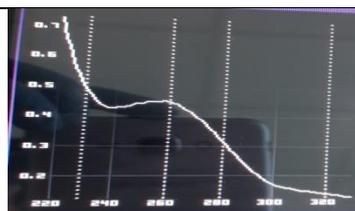
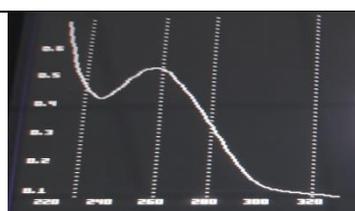
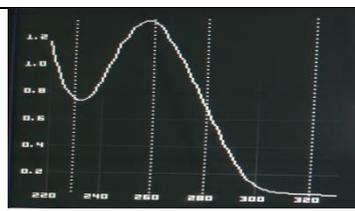
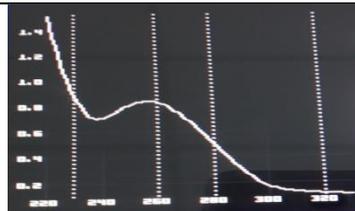
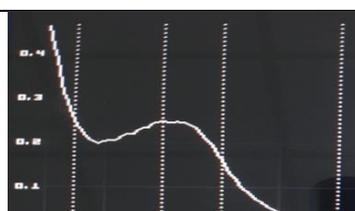
D'abord nous avons optimisé la quantité des selles (réduit de 1g vers 0.1g), afin d'éliminer le maximum de débris alimentaires qui empêchent la récupération du volume nécessaire pour la manipulation, de plus nous avons changé la concentration du lysozyme utilisé du 1 mg/ml vers 0.6mg/ml et nous avons réalisé une seule extraction par l'utilisation de phénol chloroforme (24 :24) à la place de deux extractions pour éviter une contamination phénolique. Vers la fin du protocole nous avons lavé le culot obtenu quatre fois avec l'éthanol 70% au lieu de le laver deux fois pour éliminer l'acétate de sodium et d'essayer de l'éclaircir.

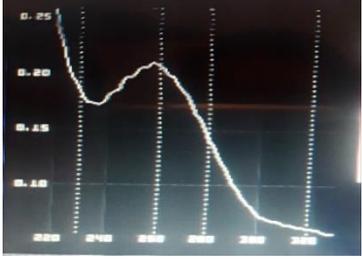
Dans les résultats obtenue nous avons remarqué que chez les personnes saines nous avons une petite quantité d'ADN propre (blanc) avec une concentration élevée de 227,0 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à 1594,0 $\mu\text{g/ml}$, et des bons ratios A260/230 variante entre 0,707 et 2,042 et A260/280 est de 1,773 jusqu'à 1,993, alors que chez les sujets malades nous avons obtenu une grande quantité d'ADN d'une couleur marron avec des concentrations faibles varient entre 88.0 $\mu\text{g/ml}$ et 1235,0 $\mu\text{g/ml}$ et des ratios moyens aller de 1,656 jusqu'à 1,985 pour A260/280 et de 0,707 jusqu'à 2,042 pour A260/230. Les tableaux I et II présentent les résultats obtenus.

Le tableau I illustre les résultats d'absorbance d'extraction d'ADN des microbiotes des patients (l'absorbance A 260, la concentration et le pic d'absorbance).

Tableau I: Les résultats des patients

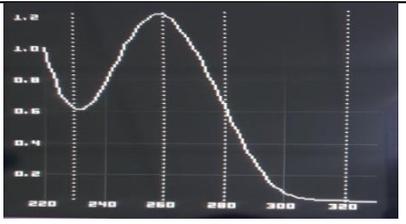
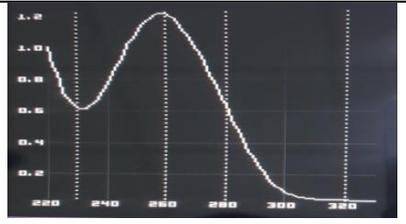
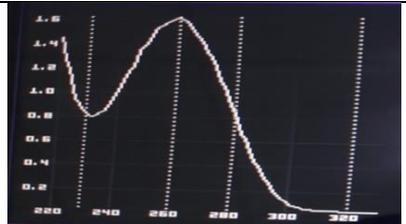
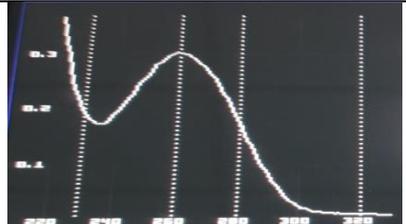
Echantillon	A 260\280	A 260\230	A 260	Concentration $\mu\text{g/ml}$	Graphe d'absorbance) (pic
3699 MF1	1,958	1,966	0,482	466,0	
1314 MFh	1,959	1,914	0,448	425,0	
3696 MFb	1,985	2,097	0,686	671,0	
3698 MFm	1,825	1,207	0,183	146,0	

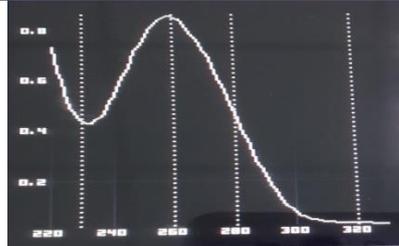
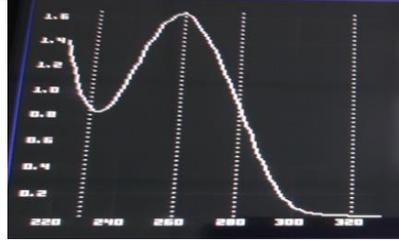
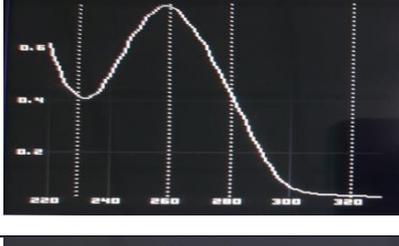
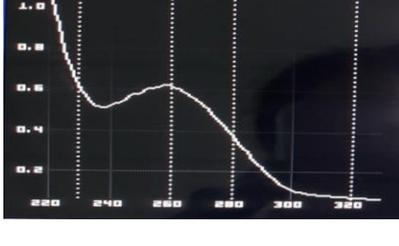
3690 MFy	1,926	1,253	0,190	183,0	
3610 MFrm	1,725	1,158	0,129	88,0	
3694 MFd	1,746	0,880	0,165	309,0	
3693 MFa	1,837	1,151	0,516	428,0	
3611 MFh	1,982	1,806	1,298	1235,0	
3695 MF	1,849	0,942	0,832	712,0	
3697 MFs	1,656	0,991	0,247	217,0	

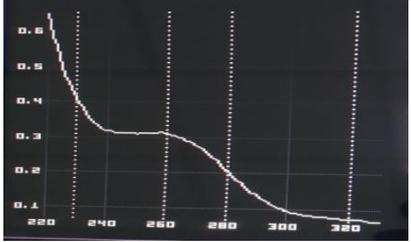
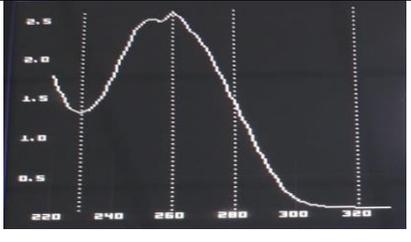
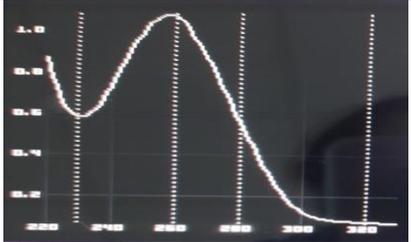
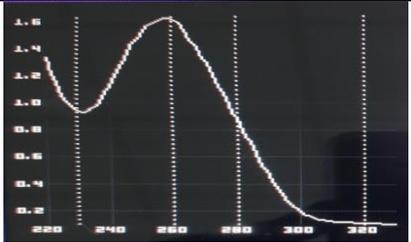
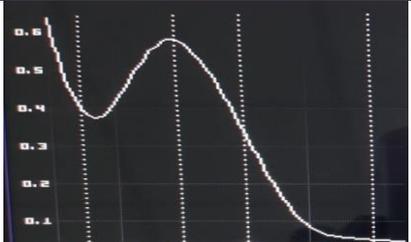
3691 MFf	1,827	1,194	0,208	148,0	
----------	-------	-------	-------	-------	---

Le tableau II présente les résultats d'absorbance d'extraction d'ADN des microbiotes des personnes saines (l'absorbance A 260, la concentration et le pic d'absorbance).

Tableau II: Les résultats des personnes saines

Echantillon n	A 260\280	A 260\230	A 260	Concentration n $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Graphe
1406 HS 26	1,838	1,850	0,921	875	
1316 FS 24	1,956	2,010	1,210	1168,0	
1403 HS 24	1,972	2,021	1,611	1566,0	
1404 FS 34	1,800	1,627	0,302	288,0	

1401 FS 30	1,905	2,042	0,855	823,0	
1402 HS 23	1,880	1,956	1,633	1594,0	
1314 FS 33	1,848	1,907	0,756	719,0	
1400 FS 26	1,993	1,764	0,308	277,0	
1315 HS 27	1,773	1,195	0,306	227,0	
3690 MF PS-M	1,794	0,998	0,618	549,0	

3692 MF	1,802	0,707	0,311	236,0	
3612 MFN	1,862	2,029	2,573	2480,0	
3691 MFN	2,018	1,936	1,066	995,0	
3693 PS-MR	1,937	1,800	1,610	1503,0	
3694 MFPSF	1,796	1,500	0,577	528,0	

En référence à l'article (**Gaur et al., 2019**), les résultats moyens étaient comme suit : [concentration $141.9\mu\text{g/ml} \pm 35.6$ à une longueur d'onde A260/280 : 1.775 ± 0.06 , à la deuxième longueur d'onde A260/230 : 1.285 ± 0.07], contrairement à nos résultats qui sont meilleures dans les quels pour les sujets malades nous avons eu des concentrations qui varient entre (88.09 et $1235,09\mu\text{g/ml}$), ratio A260/280 (1,656 et 1,985) et ratio A260/230 (1,627 et 2,042). Notamment pour les personnes saines la concentration varie entre (227,09 et $1594,09\mu\text{g/ml}$), et des bons ratios A260/230 variante entre (0,707 et 2,042) et

A260/280 est de (1,773 jusqu'à 1,993). Le tableau suivant présente une comparaison entre nos résultats et les résultats d'article (Gaur *et al.*, 2019).

Tableau III: Comparaison entre les résultats de l'article et les résultats obtenus après l'extraction

Échantillon	Concentration	A260/280	A260/230
Les résultats des échantillons de l'article			
<i>Stool</i>	141.9 ± 35.6	1.775 ± 0.06	1.285 ± 0.07
<i>Fish-gut</i> (silver carp)	238.6 ± 64.48	1.7 ± 0.07	1.37 ± 0.07
<i>Soil</i> (Sol)	430.85 ± 82.80	1.665 ± 0.04	1.24 ± 0.16
<i>Fish-gut</i> (<i>T. putitora</i>) Intestin de poisson (<i>T. putitora</i>)	92.1 ± 4.10	1.475 ± 0.50	1.15 ± 0.37
<i>Milk</i> (lait)	104.1 ± 36.48	1.72 ± 0.33	1.215 ± 0.10
Les résultats des patients			
3699MFL	466,0	1,958	1,966
1314 MFh	425,0	1,959	1,914
3696MFb	671,0	1,985	2,097
Les résultats des personnes saines			
1316 FS 24	1168,0	1,956	2,010
3612MEN	2480,0	1,862	2,029
1406 HS26	875	1,838	1,850

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Pour optimiser l'extraction des acides nucléique bactériens, nous avons utilisées les échantillons de matière fécale des patients (Alzheimer, tumeur cérébrales) et des personnes saines. Les échantillons ont été récupérés au niveau du CHU de Bejaia.

L'extraction d'ADN à partir de matière fécale est réalisée par l'utilisation de la méthode des solvants organiques "phénol-chloroforme". Les résultats obtenus après l'extraction ont donné des forts pics d'absorbance 260/280, et une concentration élevée par rapport aux résultats de l'article dont nous avons extrait le protocole de base.

Nos résultats montrent que l'optimisation du protocole d'extraction d'ADN permettant d'obtenir des ratios 260/280 et concentration idéales pour les deux catégories saines et malades. Donc d'après les résultats obtenu nous pouvons répondre à la question poser dans l'introduction et dire que le protocole optimiser est facile à l'utilisation et fiable.

Afin de compléter les résultats obtenus et de donner plus de détails et de comparer entre les microbiotes des patients souffrant de tumeur cérébrale et les personnes saines nous devrions faire de la métagénomique qui est un test quantitatif et qualitatif permet l'étude des génomes (matériel génétique ; ADN), et d'avoir une vue d'ensemble des gènes présents à un moment donnés.

Les gènes détectés peuvent servir à identifier les microbiotes, déterminer leurs fonctions métaboliques, et apporter une réponse satisfaisante aux questions concernant les microbiotes.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Alexandru G et Braden K. *Blackwell Publishing Inc Neuromodulatory Processes of the Brain–Gut Axis. Neuromodulation: Technology At the Neural Interface.* 2008, 4,251-256.

Arrieta MC et Finlay BB. The commensal microbiota drives immune homeostasis. *Front Immunol.* 2012; 3:33.

Armstrong, T.S., Cron, S.G., Bolanos, E. V., Gilbert, M.R et Kang, D-H. *Risk factors for fatigue severity in primary brain tumor patients. Cancer.*2010; 116, 2707-2715.

B

Bellono NW. *Enterochromaffin cells are gut chemosensors that couple to sensory neural pathways. Cell.* 2017;170:185–98 e116.

Bencokova, Z. Signalisation et réparation des cassures double-brin de l'ADN dans les gliomes : Modulation de la réponse aux traitements chimio-radiothérapeutiques. phdthesis. Université Joseph-Fourier- Grenoble. (2007).

Berer K. *Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. Nature.* 2011; 479:538–41.

Bienvenu, J., Vassault, A., Grafmeyer, D., De Graeve, J., Cohen, R., Beaudonnet, A. *Annales de Biologie Clinique.* In *Annales de biologie clinique.* (1999, November) ;(Vol. 57, No. 6, pp. 685-95).

Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S. *The Vagus nerve in the neuro-immune axis: implications in the pathology of the gastrointestinal tract. Front Immunol.* 2017; 8:1452.

Bravo JA. *Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:16050–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>. Forsythe P, Bienens.

Browning KN, Zheng Z, Gettys TW, Travagli RA. *Vagal afferent control of opioidergic effects in rat brainstem circuits. J Physiol.* 2006; 575:761–76.

Références Bibliographiques

C

Cussotto, S., Sandhu, K. V., Dinan, T. G. et Cryan, J. F. *The neuroendocrinology of the microbiota-gut-brain axis: a behavioural perspective* *Frontiers Neuroendocrinol.*

D

Davis M. et Glioblastoma E. *Overview of disease and treatment.* *Clin J Oncol Nurs.* 2016; 20:S2–8.

F

Felix S. et Fredrik B. *The gut microbiota — masters of host development and physiology.* *Nature Reviews Microbiology.* 25 February 2013; 12: doi: 10.1038/nrmicro2974

Ferreiro A, Crook N, Gasparrini AJ et Dantas G. *Multiscale evolutionary dynamics of host-associated microbiomes.* *Cell.* 2018; 172:1216–27.

Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N et Mills KH. *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.* *Clin Exp Immunol.* 2010; 162:1–11.

G

Gomez de Agüero M. *The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development.* *Science.* 2016; 351:1296–302.

H

Hemmer B, Archelos JJ et Hartung HP. *New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis.* *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3:291–301.

Hirota K, Turner JE, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM et Stockinger B. *Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses.* *Nature immunology.* 2013; 14(4):372–9.

Honda K et Littman DR. *The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease.* *Nature.* 2016; 535(7610):75–8.

Horai R, Zarate-Blades CR, Dillenburg-Pilla P, Chen J, Kielczewski JL, Silver PB, Jittayasothorn Y, Chan CC, Yamane H et Honda K. *Microbiota-dependent activation*

Références Bibliographiques

of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged site. Immunity. 2015; 43(2):343–53.

[http://crohn.superforum.fr/t2488-les-interactions-entre le microbiote intestinal et le cerveau.../2015](http://crohn.superforum.fr/t2488-les-interactions-entre-le-microbiote-intestinal-et-le-cerveau.../2015) (consulté le 28/08/2022).

https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1818-9_1 Aruna Pal Conventional and Basic Genomic Techniques Ab/2021 (consulté le 23/05/2022).

I

Illiano, P., Brambilla, R., et Parolini, C. *The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. The FEBS journal.* (2020), 287(5), 833-855.).

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

J

Jaglin, M. Axe intestin-cerveau : effets de la production d'indole par le microbiote intestinal sur le système nerveux central. Thèse du doctorat : Biologie, France: Université Paris Sud. (2013), 291p.

Janeway CA Jr. *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.* 1989; 54(Pt 1):1–13.

Johns MB et Paulus-Thomas JE. *Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol.* Anal Biochem 1989.

L

Lebouvier T. *The second brain and Parkinson's disease.* Eur J Neurosci. 2009; 30:735–4.

Liu LS. *A rat model of chronic gastric sensorimotor dysfunction resulting from transient neonatal gastric irritation.* Gastroenterol. 2008; 134:2070–9.

Landmana C et Quévraina E. Le microbiote intestinal: description, rôle et implication physiopathologique (Gut microbiota: *Description, role and pathophysiologic implications*). La Revue de médecine interne 37 (2016) 418–423.

Références Bibliographiques

M

Mawe GM et Hoffman JM. *Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets.* *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013; 10:473–86.

Mazzoli, R et Pessione, E. *The neuro-endocrinological role of microbial glutamate and GABA signaling.* *Frontiers in Microbiology.* 2016; 7, 1934.

Mohita G ,Aarushi V, Anoop S, Vishal S,Himani Kh, Ram K,Jung-K ,Vipin Ch,Kalia R,Yogendra S. *Comparison of DNA Extraction Methods for Optimal Recovery of Metagenomic DNA from Human and Environmental Samples.* *Indian J Microbiol.* 2019.

O

Okun E, Griffioen KJ, Son TG, Lee JH, Roberts NJ, Mughal MR, Hutchison E, Cheng A, Arumugam TV et Lathia JD, et al. *TLR2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation.* *Journal of neurochemistry.* 2010; 114(2): 462–74.

P

Papassotiropoulos A. *Cholesterol 25-hydroxylase on chromosome 10q is a susceptibility gene for sporadic Alzheimer's disease.* *Neuro-Degenerative Diseases.* 2005; 2:233–41.

Plovier H et Cani PD. *Enteroendocrine cells: metabolic relays between microbes and their host.* *Endocr Dev.* 2017; 32:139–64.

Protima Amon et Ian Sanderson. *What is the microbiome.* *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice.* (2017); 102(5): edpract-2016-311643.

Q

Qianquan Ma. *Impact of microbiota on central nervous system and neurological diseases: the gut-brain axis.* *Ma et al. Journal of Neuroinflammation.* (2019); 16:5.

R

Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R et Schwartz M. *Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis.* *Nature cell biology.* 2007;9(9):1081–8.

Références Bibliographiques

Rizzatti.G, Lopetuso L R, Gibiino G, Binda C et Gasbarrini A. *Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases.* (2017)

Ruisseaux M, Rouquette I et Adam J. [Efficacy of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors and PD-L1 testing in thoracic cancers]. *Ann Pathol* 2017; 37:61-78.

S

Samii A, Nutt JG et Ransom BR. *Parkinson's disease.* *Lancet.* 2004; 363:1783–93

Schneider SA et Alcalay RN. *Neuropathology of genetic synucleinopathies with Parkinsonism: review of the literature.* *Mov Disord.* 2017; 32:1504–23.

Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH et Mazmanian SK. *The central nervous system and the gut microbiome.* *Cell.* 2016; 167:915–32.

Sites web:

Sveinbjornsdottir S. *The clinical symptoms of Parkinson's disease.* *J Neurochem.* 2016; 139(Suppl 1):318–24.

Sylvie Rebuffat et Séverine Zirah. Laboratoire Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes UMR 7245 CNRS - MNHN — 28 février 2018
(Localisation de différents types de microbiote)

T

Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ et Corey-Bloom J. *The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD.* *Neurology.* 2004; 62:1984–9.

Tremlett H, Bauer KC, Appel-C S, Finlay BB et Waubant E. *The gut microbiome in human neurological disease: a review.* *Ann Neurol.* 2017; 81: 369–82.

V

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner H et Hafler DA. *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.* *J Exp Med.* 2004; 199:971–9

Références Bibliographiques

W

Wahlstrom A, Sayin SI, Marschall HU et Backhed F. *Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism.* Cell Metab. 2016; 24:41–50.

Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, Theodorou V, Dekker J, Meheust A, de Vos WM, et al. *Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers.* American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2017; 312(3):G171–93.

Y

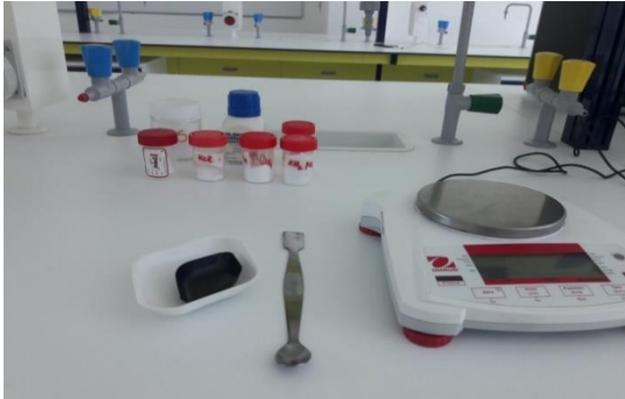
Yankner BA, Duffy LK et Kirschner DA. *Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides.* Science. 1990; 250:279–82.

Annexes

Annexes

Annexe 1: Matériels utilisée pour préparer les solutions

Les équipements de laboratoire:



La cuillère, pH mètre, balance, agitateur, autoclave, bécher, erlenmeyer, éprouvette, embouts

Les poudres : KCl, NaCl, KH₂PO₄, SDS, EDTA, tris-base

Les solutions: NaOH, HCl

Annexe 2: Préparation des solutions

- **Le tampon d'homogénéisation** : (100 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 50 mM EDTA pH 8,0 et 1 M NaCl)
- **Tris-cl**

100mL de Tris-HCl pH8 10mM : peser 0,121 g de tris base (par exemple : Trizma base et dissoudre dans 80mL d'eau ultrapure (18 MΩ). Ajuster le pH avec de l'HCl. Ajuster le volume à 100mL. Autoclave (stériliser).

- **EDTA:**

$$v=200\text{ml}=0,2\text{l} \quad , \quad [50\text{Mm}] = 0,05\text{M} \quad , \quad M=292,2438\text{g/mol}$$

$$n=0,05 \times 0,2 = 0,01\text{mol/l} \quad m=n.M \quad m=0,1 \times 292,2438 \quad m=2,92$$

- **NaCl:**

$$v=200\text{ml}=0,2\text{l} \quad , \quad [1\text{M}] \quad , \quad M=58,44$$

$$n=1 \times 0,2 = 0,2 \quad , \quad m=n.M \quad m=0,2 \times 58,44 \quad m=11,688\text{g}$$

- **Préparation de 25:25 Phénol: chloroforme:**

Amener la bouteille de 50 g de phénol sous la hotte, l'ouvrir et verser 100 ml de TrisCl 50 mM pH8 Fermer le couver hermétiquement et agiter doucement.

Annexes



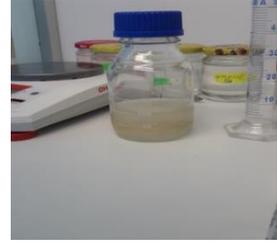
Etape1: Peser 50g de phénol, après verser le dans un flacon.
(Photographie Originale)



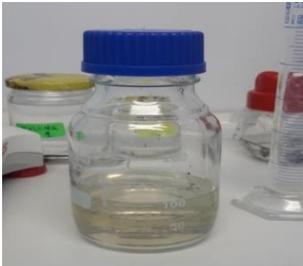
Etape2: verser 50ml de tris-cl dans une éprouvette.
(Photographie originale)



Etape3: verser 50ml de tris-cl dans le flacon de phénol.
(Photographie Originale)



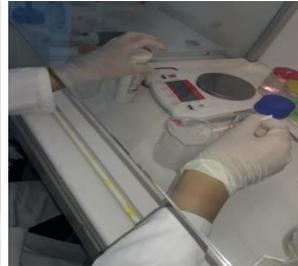
Etape4: Mélanger doucement et laissez reposer pendant une heure ou deux heure jusqu'à ce que le phénol se liquéfie et que les phases se séparent. (Photographie originale)



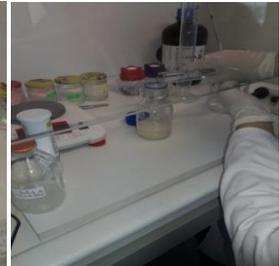
Etape5: Présente les deux phases séparées de phénol et tris-cl.
(Photographie originale)



Etape6: Retirer le surnageant à l'aide d'une pipette (le jeter dans le conteneur "déchets de solvants chlorés").
(Photographie originale)



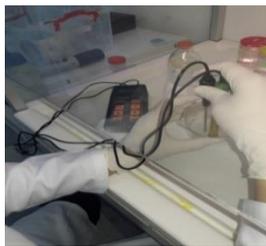
Etape7: vérifier le pH de surnageant à l'aide des bandelettes de pH.
(Photographie originale)



Etape8: Ajouter 50 ml supplémentaires de TrisCl 50 mM pH8 et agiter doucement. Laissez reposer pendant quelques minutes pour séparer.
(Photographie originale)



Etape9: Retirer le surnageant à l'aide d'une pipette (le jeter dans le conteneur "déchets de solvants chlorés"). (Photographie originale)



Etape10: Vérifier le pH de surnageant retiré à l'aide de pH mètre. (Photographie originale)

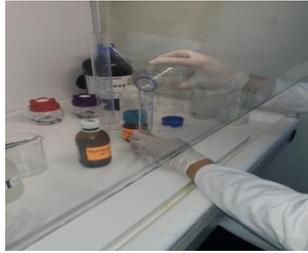


Etape11: Répéter l'étape "ajoute de 50ml de tris-cl" quatre ou cinq fois jusqu'à ce que le pH du surnageant soit compris entre 7 et 8.
(Photographie originale)



Etape 12: Combinez 50 ml de chloroforme (3-méthyl-1-butanol) dans un cylindre de mesure en verre (éprouvette) pour obtenir 25 :25.
(Photographie originale).

Annexes

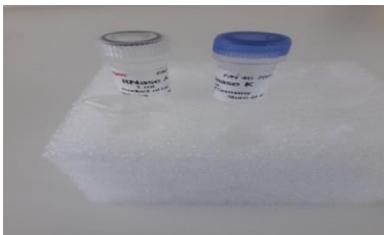


Etape13 : Recouvrir de 5 ml de TrisCl 50 mM pH8. (Photographie originale).



Etape14: Conserver verticalement dans des plateaux en polystyrène au congélateur à -20°C.

➤ Lysozyme, protéinase K, RNase A



Lysozyme: 0.6mg/ml
protéinase K: (20 mg/ml)
RNase A: (10 mg/ml)

➤ **SDS (10% p/v) 10g dans 100ml**

Préparation de la solution de SDS



Verser le SDS dans 100ml de l'eau distillée dans un



Etape2: Vortexer bien afin de bien mélangé le SDS avec l'eau (**originale**)

Etape1: Peser 10g de SDS (**originale**)

➤ **Acétate de sodium 7,5 M (pH 5,4)**

Préparation de la solution d'acétate de sodium :

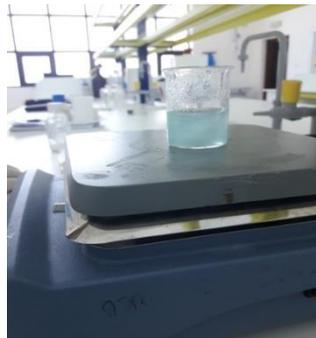
$V=8\text{ml}$, [7.5], $\text{ph}=5.4$ $M=82,0343\text{g/mol}$

$n=c.v=7,5 \times 8$ $n=60\text{mol/l}$

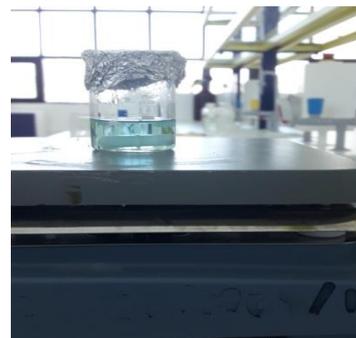
$n=m/M$ $m=n.M$ $m=60 \times 82,0343$ $m=4922,058\text{mg}$ $m=4,92\text{g}$



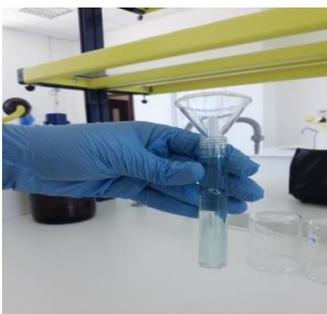
Etape1: Peser 4,92g d'acétate de sodium. (Photographie Originale)



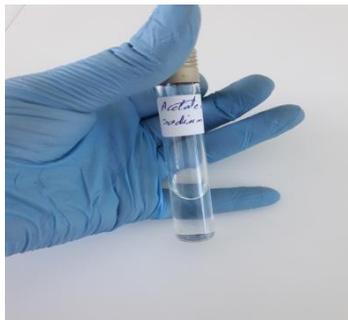
Etape2: Verser la quantité d'acétate de sodium dans un bécher qui contient 8ml de l'eau distillé (Photographie originale).



Etape3: Laisser le bécher sur l'agitateur jusqu'au l'acétate dissoudre dans l'eau distillée (Photographie originale)



Etape4: Verser la solution d'acétate de sodium dans un tube. (Photographie originale).



Etape5: Solution d'acétate de sodium (Photographie originale).

Préparation de l'éthanol 70%

Verser 70% (70ml) de l'éthanol dans une éprouvette graduée, compléter avec 30%(30ml) de l'eau distillée.



Annexe 3: Rôles des solutions utilisées:

Ethanol absolu pour la précipitation

Ethanol 70% pour lavage

Lysozyme: permet l'hydrolyse des liaisons peptidoglycanes de la paroi bactérienne, notamment les grammes positifs, [une protéine présente dans les globules blancs (granulocytes et monocytes), dont le rôle est de détruire la paroi des bactéries lors des infections.]

Protéine K: permet la lyse des protéines et des nucléases. [La protéinase K est utilisée pour le clivage des protéines dans les préparations d'acides nucléiques. Il est principalement utilisé dans la purification des acides nucléiques ou pour l'élimination des nucléases.]

SDS (Software-Defined Storage): c'est un détergent permet de détruit la membrane cellulaire, dissocie l'ADN des protéines.

Acétate de sodium et de l'éthanol: Ces réactifs permettent de précipiter l'ADN à basse température pour le séparer des constituants cellulaires donc le purifier.

Annexes

Acétate de sodium: permet d'éviter la séparation des doubles brins d'ADN.

Phénol-chloroforme: isoler les acides nucléiques, le phénol dégrade les protéines et le chloroforme dégrade les lipides.

[Procédé d'extraction liquide-liquide utilisé en biochimie et en biologie moléculaire pour isoler les acides nucléiques — ADN et ARN — en les séparant des protéines]

EDTA: Acide éthylènedinitrilo tétra-acétique

Après la lyse cellulaire, l'EDTA limite la dégradation de l'ADN en liant les ions Mg^{2+} , cofacteurs nécessaires des nucléases bactériennes. De cette manière, il inhibe les nucléases conduisant à la rupture de la paroi cellulaire et de la membrane cellulaire.

Tris-HCl: Le phénol (saturé en Tris-HCl, pH8) va permettre d'extraire les protéines avec ou sans ADN. L'ADN libre de nucléosomes (phase aqueuse) peut être précipité avec deux volumes d'éthanol à 100%

NaCl: La solution NaCl 1M utilisée lors de l'extraction de l'ADN fournit des ions Na^+ qui bloquent la charge négative des phosphates de l'ADN. Le phosphate chargé négativement dans l'ADN provoque la repousse des molécules.

L'éthanol froide et l'isopropanol: l'ajout d'éthanol ou d'alcool isopropylique (alcool à friction) fera regrouper l'ADN qui formera un précipité blanc visible. Il est important d'utiliser de l'alcool froid, car il permet d'extraire une plus grande quantité d'ADN. Si l'alcool est trop chaud, l'ADN peut se dénaturer, ou se désintégrer.

RNase: pour éliminer les molécules de l'ARN

Tampon d'homogénéisation: permet de solubiliser l'ADN et de le protéger de la dégradation chélateur de cation Mg^{2+} .

Annexes

Annexe 4 :

Les tableaux suivants illustrent les fiches techniques des patients et des personnes saines :

Tableau I: Fiche technique des sujets malades

Echantillon	Date de prélèvement	sexe	Age	Cause d'hospitalisation (maladies)	Autre maladies (information personnelle)
3694MFd	07/05/2022	Homme	23 ans	FCP tumeur cérébrale	Retard mental dès la naissance
3699MFI	08/06/2022	Homme	48ans	Tumeur cérébrale Gliome	/
1314 MFh	08/04/2022	Femme	65 ans	Méningiome	Goitre, cholestérol, hypertension
3696 MFb	20/05/2022	Homme	46ans	Gliome	Aucune maladie
3698 MFm	04/06/2022	Femme	61ans	Tumeur cérébrale PEIC	Allergie aux B-lactames
3690 MFy	12/04/2022	Homme	56ans	PEIC tumeur cérébrale	Hypertension, paralysie à moitié le côté gauche, constipation, diabète dérégulé
3610MF rm	08/06/2022	Femme	70 ans	Tumeur cérébrale Gliome	/
3691 MF f	17/04/2022	Femme	64 ans	PEIC tumeur cérébrale	Covid(2022), déjà opéré (il y a 20ans), trouble de mémoire, crise convulsives
3695 MFs	15/05/2022	Femme	50 ans	Méningiome	Aucune maladie
3693 MF a	03/05/2022	Homme	63ans	PEIC tumeur cérébrale	Déficit moteur, trouble de comportement, syndrome HSC (depuis 2 ans)
3611MF h	13/06/2022	Femme	36 ans	Méningiome	Aucune maladie
3697MF s	26/06/2022	Homme	64ans	Méningiome	Epilepsie

Annexes

Tableau II: Fiche technique des personnes saines:

échantillon	Date de prélevement de l'échantillon	Age	Sexe	Maladie
1400 FS 26	30/05/2022	26	Femme	Aucun
1401 FS 30	01/06/2022	30	Femme	Covid en juillet 2021
1402 HS 23	30/05/2022	23	Homme	/
1403 HS 24	02/06/22	24	Homme	/
1404 FS 34	30/05/2022	34	Femme	Covid en février 2022
1406 HS 26	02/06/2022	26	Homme	/
1314 FS 33	15/06/2022	33	Femme	Aucun
1315 HS 27	15/06/2022	27	Homme	/
1316 FS 24	15/06/2022	24	Femme	Aucun
3690 MF-PS M	10 /06/2022	43	Femme	Cœur, diabète
3692 PS_ MFF	10/06/2022	40	Femme	Colonne problème digestif covid janvier
3691 MFN	20 / 06/2022	47	Femme	Hyper-tention
3693 PS_MR	28/06/2022	41	Femme	/
3694 MF PSF	30/06/2022	56	Homme	Hernie discale
3612 MFN	20/04/2022	44	Homme	Hernie discale

Résumé

Le microbiote est l'ensemble des micro-organismes, qui vivent naturellement dans le tractus digestif. Différentes études ont démontré que ces derniers peuvent influencés sur le SNC dans lequel ils communiquent entre eux à travers quatre différentes voies (Sanguine, Nerveuse, Immune, Endocrine). Les échantillons de la matière fécale des patients atteints de tumeur cérébrale ont été récoltés au niveau du CHU de Bejaia Khelil Amrane. L'analyse moléculaire a été réalisée dans le laboratoire de Génie Biologique des Cancers de la Faculté Médecine de l'Université de Bejaia dans lequel nous avons optimisé un protocole chimique, pour l'extraction du matériel génétique des microbiotes. D'abord l'ensemble des données ont montrés que les patients âgés entre 40 à 60 ans sont les plus touchés par la tumeur cérébrale. Contrairement au personne a jeune âge. Par rapport ou sexe, le sexe masculin est le plus exposé au risque de contracté des tumeurs cérébrales que le sexe féminin.

Nos résultats d'extraction du matériel génétique des microbiotes obtenus, par la réalisation de notre protocole optimisé, nous avons remarqué chez les personnes saines une petite quantité d'ADN propre (blanc) avec une concentration élevée et de bons ratios (A260/230, A260/280), alors que chez les sujets malades nous avons obtenu une grande quantité d'ADN d'une couleur marron avec des faibles concentrations, de mauvais ratios (A260/230) et de bons ratio (A260/280) par rapport aux personnes saines. Ratio 260/230 inférieure à 1,8 indique une contamination protéique. Alors que les résultats cité dans l'article sont les suivant : [concentration $141.9\mu g/ml \pm 35.6 \mu g/\mu l$ à une longueur d'onde A260/280 : $1.775 \pm 0.06 \mu g/\mu l$; à la deuxième longueur d'onde A260/230 : $1.285 \pm 0.07 \mu g/\mu l$].

Mots clés : Microbiote, SNC, Tumeurs cérébrales, Matière fécale, ADN.

Abstract

The microbiota is the set of microorganisms, which live naturally in the digestive tract. Various studies have shown that these can influence the CNS in which communicates with each other through four different pathways (Sanguine, Nervous, Immune, Endocrine). The samples of the faeces of patients with brain tumors were collected at the level of CHU of Bejaia Khelil Amrane. The molecular analysis was carried out in the Laboratory of Biological Engineering of Cancers of the Faculty of Medicine of the University of Bejaia in which we optimized a chemical protocol, for the extraction of genetic material from microbiota. First, all the data showed that patients aged between 40 and 60 are the most affected by brain tumours. Unlike the person at yellow age who are the least affected. In relation to sex, the male sex is the most exposed to the risk of contracting brain tumors than the female sex.

Our results of extraction of the genetic material of the microbiota obtained by the realization of our optimization on the protocol, we noticed the obtaining in the healthy people, of a small quantity of clean DNA (white) with a high concentration and good ratios (A260/230, A260/280), while in sick subjects we obtained a large amount of DNA of a brown color with low concentrations of bad ratios (A260/230) and good rations (A260/ 280) compared to healthy people. Ratio 260/230 less than 1.8 indicates protein contamination. While the results cited in the article are as follows: [concentration $141.9 \pm 35.6 \mu g/\mu l$ at a wavelength A260/280: $1.775 \pm 0.06 \mu g/\mu l$; at the second wavelength A260/230: $1.285 \pm 0.07 \mu g/\mu l$].

Keywords: Microbiota, CNS, Brain tumor, Faeces, DNA