



*Les technologies motrices de l'immunologie*

**3<sup>ème</sup> Partie :**

**Les applications à l'homme**

**I. L'analyse du sang : molécules et cellules.**

**II. Maladies infectieuses et microbiomes**

**III. Tumeurs et cancers.**

**IV. Terrain génétique.**



## **3<sup>ème</sup> Partie :** **Les applications à l'homme**

### **I. L'analyse du sang : molécules et cellules.**

**A. Immuno-essais.**

**B. Spectrométrie de masse.**

**C. Expression des gènes dans les cellules du sang.**

**D. Répertoires des cellules B et T analyse moléculaire.**

**E. Analyses cellulaires**



## **I. L'analyse du sang : molécules et cellules.**

**Prise de sang 10-20 ml, en général < 50 ml.**

**Pour transfusion, volumes supérieurs (< 500 ml)  
± plasmaphérèse.**

**Autres prélèvements peu ou non invasifs.**

- urine,
- salive,
- cellules cutanées, cheveux (analyses génétiques).

**Enjeu analytique considérable. Mais l'analyse du sang ne peut renseigner sur tout ce qui se passe dans l'organisme.**



## Composition de 1 ml de sang :

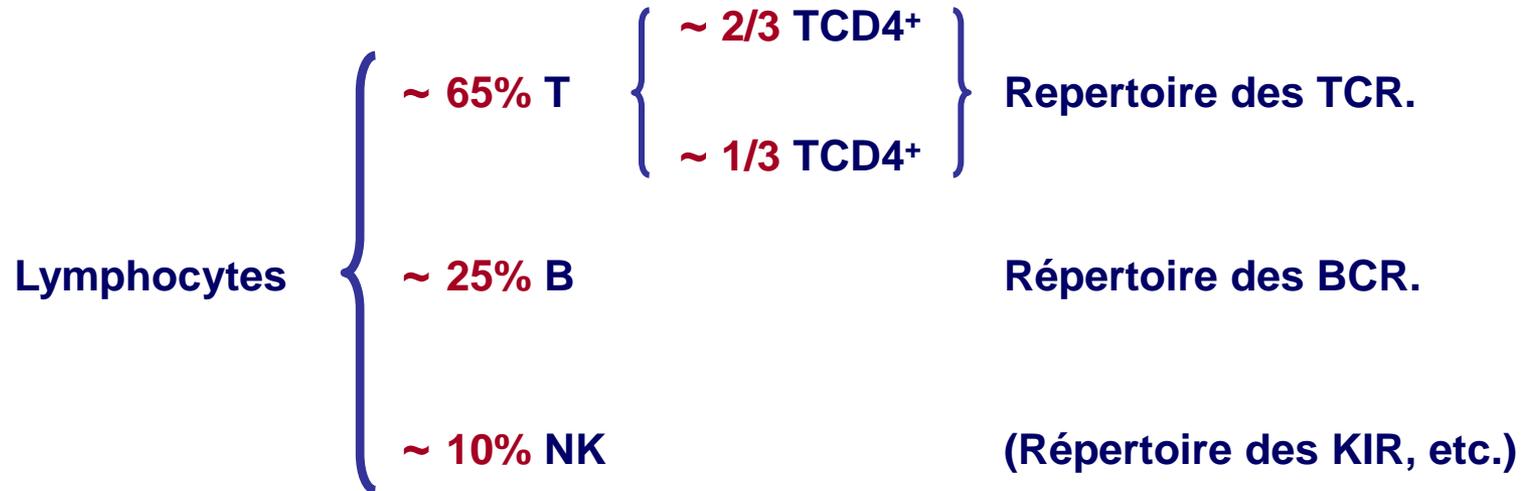
### 1. Cellules

~  $5 \cdot 10^9$  globules rouges.

~  $3 \cdot 10^8$  plaquettes

~ 5 à  $10 \cdot 10^6$  globules blancs dont

{  
~ 30% Lymphocytes ( $1.5$  à  $3 \cdot 10^6$ )  
~ 60% neutrophiles  
~ 10% éosinophiles, basophiles,  
DC, monocytes.



- Dans une prise de sang de 10 ml, on trouve approximativement :
- 5 à 10 millions de cellules T.
  - 2 à 4 millions de cellules B.



## **2. Protéines 55% (en mg)**

|                  |                         |
|------------------|-------------------------|
| - Serumalbumine  | 42                      |
| - Globulines     | 24 (= Ig + fibrinogène) |
| - Lipides        | 5                       |
| - Cholestérol    | 0.2                     |
| - Phospholipides | 0.15                    |
| - Glucose        | 0.1                     |
| - Acides aminés  | 0.05                    |



## **A. Immunoessais**

**Présence et quantité de composés solubles identifiés, protéines solubles, relâchées par tissus enflammés ou endommagés, métabolites.**

**Emploi d'anticorps spécifiques.**

**Limites :**

- **spécificité**
- **sensibilité,**
- **multiplexage.**



## **1. Les imperfections**

**Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. J Immunol Methods. 2009 Aug 15;347(1-2):3-11.**

**Progrès considérables (1960) tests radioactifs, enzymatiques, fluorescents, luminescents. Systèmes d'amplification.**

**MAIS :**

- **Standardisation entre kits de réactifs.**
- **Polymorphismes génétiques.**
- **Auto – anticorps dans le sérum (ex : anti-thyroglobuline).**
- **Anticorps anti-réactifs.**
- **Analyte saturant.**



## **2. Quelques pistes**

**Hirst ER, et al. Bond-rupture immunosensors-a review. Biosens Bioelectron. 2008 Jul 15;23(12):1759-68.**

**SPR Résonance plasmonique de surface.**

**Biosenseurs / potentiomètres.**

**Biosenseurs / ondes acoustiques.**

**Aptamères vs. Anticorps.**



### **3. Cytométrie de flux**

#### **Miniaturisation**

**Kim JS, et al. Multiplexed detection of bacteria and toxins using a microflow cytometer. Anal Chem. 2009 Jul 1;81(13):5426-32.**

**→ Au lit du malade.**

#### **Multiplexation**

**Krishnan VV, et al. Multiplexed microbead immunoassays by flow cytometry for molecular profiling: Basic concepts and proteomics applications. Crit Rev Biotechnol. 2009;29(1):29-43.**

**→ 500 analytes.**



## **4. Immunoessais miniaturisés avec code barre**

Fan R, et al. Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. *Nat Biotechnol.* 2008 Dec;26(12):1373-8.

**Puces spécialisées pour séparation du sérum et capture d'anticorps.**

**DEAL (= DNA encoded antibody library) pour codage spatial.**

**Oligonucleotides imprimés dans les canaux microfluidiques.**

**Capture des anticorps (haute densité).**

- **Séparation du sérum, puis analyse multiplex d'une quinzaine de biomarqueurs en moins de 10 mn après piqûre au doigt.**
- **Dosage hCG (Gonadotrophine Chorionique humaine ) sur 5 logs.**



## **B. Spectrométrie de masse (MS)**

### **1. Quantification ciblée.**

Digestion par protéase → peptides → HPLC → spectrométrie de masse (masse / charge de fragment) → peptides du fragment.

- Spectrométrie de masse (masse / charge du fragment)  
→ peptides du fragment.

3 niveaux de spécificité et normalisation interne par peptide  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ .

Fractionnement préalable du sérum, immuno déplétion ou enrichissement (10 logs).

- Polymorphismes génétiques, modifications post-traductionnelles, isoformes.



## **2. Profilage du protéome sanguin.**

**Callesen AK, et al. Serum protein profiling by solid phase extraction and mass spectrometry: a future diagnostics tool? Proteomics. 2009 Mar;9(6):1428-41.**

**Electrophorèse 2D : inadaptée à la clinique.**

**Plusieurs méthodes de MS de sensibilité et de débits différents.**

- LC-MS / MS      Identité**
- SELDI / MS      Haut débit, résolution faible.**
- MALDI / MS      Haut débit, identification ?**



## **Importance des purifications préalables**

- **Chromatographie**      **Phase reverse (hydrophobicité).**  
**Phase normale (ligands hydrophiles, polaires).**  
**Echange d'ions.**
- **Chromatographie d'affinité. Ligands d'affinité sélection / déplétion.**

## **Solutions variées**

- **« Egaliseur » de protéines.**
- **Miniaturisation des colonnes.**
- **Billes magnétiques fonctionnalisées, etc.**
- **Applications cliniques : Ex cancer du sein (72 pics) d'intensités différentes. (spécificité : 85 %).**



COLLÈGE  
DE FRANCE  
—1530—

*Professeur Philippe Kourilsky  
Année 2009-2010*

### **3. HUPO**

**Omenn GS, Aebersold R, Paik YK. 7(th) HUPO World Congress of Proteomics: launching the second phase of the HUPOPlasma Proteome Project (PPP-2) 16-20 August 2008, Amsterdam, The Netherlands. Proteomics. 2009 Jan;9(1):4-6.**

**Aebersold R. A stress test for mass spectrometry-based proteomics. Nat Methods. 2009 Jun;6(6):411-2.**

**Patwa TH, et al. All-liquid separations, protein microarrays, and mass spectrometry to interrogate serum proteomes: an application to serum glycoproteomics. Methods Mol Biol. 2009;520:75-87**



**Mélange de 20 protéines purifiées avec peptide tryptique de 1250 Da distribué à 27 laboratoires pour LC-MS.**

**Rapport initial. Identifications correctes 7 / 27.**

**Pourtant la plupart des peptides avaient été correctement détectés.**

**➤ Problèmes de qualité des bases de données.**

**- Moteurs de recherche et identifiants.**



## C. Expression des gènes dans les cellules du sang

### 1. Micro-arrays vs lecture digitale

Geiss GK, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.* 2008 Mar;26(3):317-25.

#### 2 sondes pour chaque mRNA

- Sonde de capture (35-50 n complémentaires) + biotine
- Sonde de révélation = séquence spécifique + ADN (300 – 500 n)  
avec 7 ARN spécifiques et 4 fluorophores = 16 384 combinaisons

Hybridation, fixation sur matrice de stréptavidine, élongation, lecture.



- **Analyse simultanée de 509 gènes < 100 ng d'ARN non amplifié.**
  - **Idem avec 2 x amplification sur micro-array.**
  - **Comparaison avec PCR en temps réel.**

**Sensibilité = PCR > micro-array.**

- **Mesure des ARN peu abondants 0.1 à 0.5 f M – reproductibilité.**

**Signatures 30 à 500 gènes.**



## **2. Problèmes de déconvolution**

**Watkins NA, et al. A HaemAtlas: characterizing gene expression in differentiated human blood cells. Blood. 2009 May 7;113(19):e1-9.**

**> 300 marqueurs CD**

**Purification et profilage : érythroblastes, mégacaryocytes, cellules B, CTL  
T helper, NK, granulocytes, monocytes.**



### **3. Analyse modulaire.**

**Chaussabel D, et al. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. Immunity. 2008 Jul 18;29(1):150-64.**

#### **a) Construction de modules transcriptionnels**

**Petits sous-ensembles de gènes d'expression coordonnée dans une série de pathologies.**

**Processus en 2 étapes, « data-driven ».**

**Mené à partir de 239 échantillons de PBMC.**

**Caractérisation fonctionnelle de 28 modules.**



## **b) Cartographie modulaire physiopathologique des individus.**

**Plusieurs modes de représentation.**

**Statistiques.**

**Ex Lupus.**



## **4. Combinaisons transcriptome / protéome.**

**L'étude des acides nucléiques est plus globale, précise et robuste que celle des protéines.**

**Mais les informations obtenues ne sont pas de même nature.**

### **➤ Combinaison des deux approches.**

**Zhang L, et al. Systems biology of human benzene exposure. Chem Biol Interact. 2010 Mar 19;184(1-2):86-93.**



**Kurian SM, et al. Biomarkers for early and late stage chronic allograft nephropathy by proteogenomic profiling of peripheral blood. PLoS One. 2009 Jul 10;4(7):e6212.**

**42 + 35 patients transplantés.**

**CAN = Chronic allograft nephropathy.**

**Biopsies : Micro-arrays - différences dans 1000-1500 gènes.**

**PBL : MS = 135 protéines spécifiques de CAN légère.**

**322 protéines spécifiques de CAN modérée ou sévère.**

**Signatures prédictives à 80 % pour CAN légère.**

**92 % pour CAN modérée ou sévère.**



## **D. Les répertoires des cellules B et T : analyse moléculaire**

### **a) L'immunoscope**

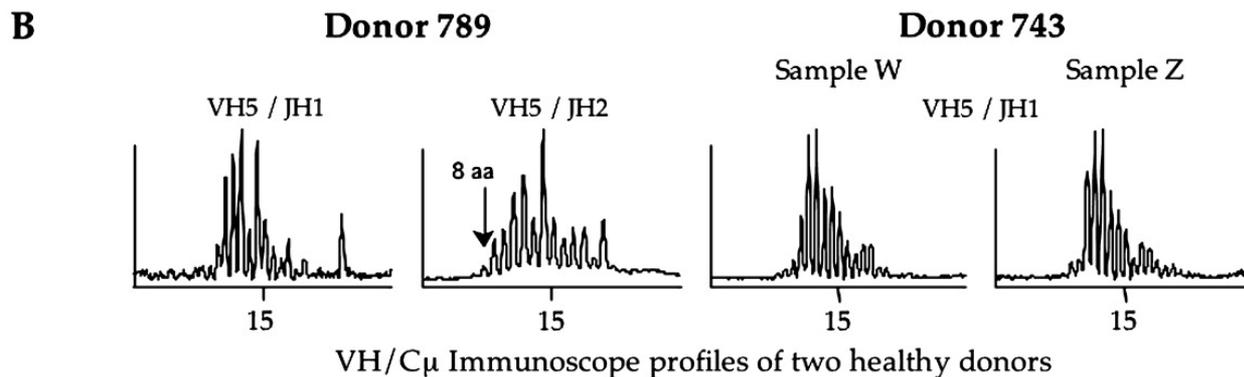
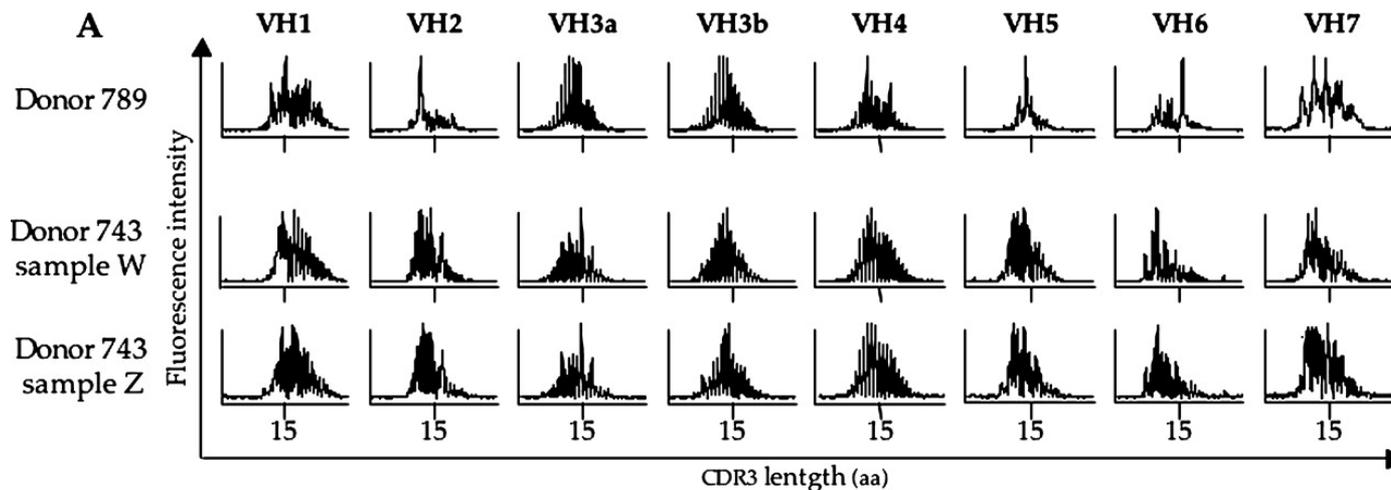
**Dimension des répertoires T et B chez l'homme :**

- Réarrangements V(D)J C
- Variation de la taille du CDR3
- Association 1 chaîne lourde / 1 chaîne légère.
- **Plusieurs dizaines ou centaines de millions de TcR ou BcR différents.**

**Taille des régions hypervariables dans différentes combinaisons**

- Réduction de la complexité.
- Séquençage des pics correspondants à une taille de CDR3.

## Immunoscope profiles from two healthy donors



Lim A, et al. Many human peripheral VH5-expressing IgM<sup>+</sup> B cells display a unique heavy-chain rearrangement. *Int Immunol.* 2008 Jan;20(1):105-16. **FIG 2**



**Lourdeur et flexibilité. Automatisation ?**

**Identification indépendante des chaînes lourdes et légères.**

**Interprétation biologique : données fonctionnelles ?**

➤ **Compléments et alternatives.**

**Analyse de sous-populations fonctionnelles**

- **couplage avec nature de l'antigène.**
- **Identification simultanée d'autres paramètres (expression de cytokines).**

**Autres dispositifs de lecture (puces à oligonucléotides, séquençage).**

**PCR sur cellule unique.**



## **b) Le séquençage massif**

Weinstein JA, et al. High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire. *Science*. 2009 May 8;324(5928):807-10.

**Régions CDR3 des chaînes lourdes Ig, surtout IgM.**

**Le poisson zèbre a environ 300.000 cellules B (souris  $10^3$  homme  $\times 10^5$ ).**

**14 individus, 30.000 à 110.000 séquences par individu, 640 Mb.**

**--> courbes de saturation : 1 200 à 3500 séquences uniques (< 5000)**



## **Quel avenir ?**

**Séquençage de 100 millions de régions CDR3 de 100nt = 10 milliards de nt.**

**> 1 génome humain**

**Identification des deux chaînes H et L ?**

**Données structurales ? Fonctionnelles ?**



## **c) Le répertoire des auto-anticorps**

**Madi A, Hecht I ... Cohen IR, Ben-Jacob E. et al. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 25;106(34):14484-9.**

**Puces à auto-antigènes.**

**Les répertoires IgM des nouveau-nés sont « universels » et semblables.**

**Ceux des mères sont organisés et « modulés » et différents les uns des autres.**

**Les répertoires IgG des nouveau-nés sont différents les uns des autres, mais liés à ceux de la mère.**



## **E. Les analyses cellulaires**

**Principalement : les progrès de la cytométrie de flux.**

**Définition de catégories cellulaires pertinentes.**

- **Marqueurs CD (> 300).**
- **Marqueurs intracellulaires : pénétration et toxicité,  
Utilisation limitée de la GFP.**

**Cellules B et T spécifiques d'un antigène donné (compartiment mémoire).**

- **Problème numérique.**



**Schepers K, et al. Dissecting T cell lineage relationships by cellular barcoding. J Exp Med. 2008 Sep 29;205(10):2309-18.**

**Etiqueter les cellules progénitrices individuelles avec codes-barres (98nt, semi aléatoire).**

**Librairies de ~ 5000 plasmides : retrovirus, GFP, code barre.**

**Cellules marquées ex vivo par transduction rétrovirale.**

**Réintroduction chez la souris.**

**Suivi de l'évolution des populations cellulaires (puces avec codes barres) en composition et localisation (organes, tumeurs).**

**Utilisable chez l'homme pour l'immunothérapie cellulaire ???**



## **Simplification et miniaturisation de la cytométrie de flux : microfluidique**

### **Fonctionnalisation des tests.**

**McGrath KE, et al. Multispectral imaging of hematopoietic cells: where flow meets morphology. J Immunol Methods. 2008 Jul 31;336(2):91-7.**

**Schachnik NC, et al. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. J Immunol Methods. 2009 Apr 15;343(2):103-11.**



Chaire d'Immunologie Moléculaire

## *Les technologies motrices de l'immunologie*

### **3<sup>ème</sup> Partie :**

## **Les applications à l'homme**

I. L'analyse du sang : molécules et cellules.

**II. Maladies infectieuses et microbiomes**

III. Tumeurs et cancers.

IV. Terrain génétique.



## **A. Les maladies infectieuses**

### **1. Signatures de la sévérité de l'infection**

#### **a. Infection par Salmonella Typhimurium**

**Thompson LJ. et al. Transcriptional response in the peripheral blood of patients infected with Salmonella enterica serovar Typhi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 29;106(52):22433-8.**

**Delta du Mékong (200/100.000).**

**Infections récurrentes et porteurs asymptomatiques (5%)**

**29 patients : T1 – antibiotiques - T28 – T270.**



- **Transcriptome. Etude de 1082 transcrits.**
- **Réponse T28 homogène, différente des contrôles (malgré antibiotique).**
- **Réponse T270 hétérogène : retour à la normale variable.**



- **Phase aigüe (T1)**      **Neutrophiles** ↗ **plaquettes** ↘ **Lymphocytes** ↘
  
- **Convalescence (T28)**      **β IFN et fonctions “non immunitaires”.**
  
- **Guérison (T270)**      . **Rétention variable de la signature immunitaire de la convalescence.**  
   . **Rôle des neurotransmetteurs ? Suppression ?**
  
- ▶ **Problèmes généraux :**  
  
    **Déconvolution : mélange de cellules.**  
  
    **Homogénéité des patients, normalité, autres infections.**



## **b. Infection par les virus de la Dengue et du Chikungunya :**

**Long HT, Hibberd ML, et al. Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. J Infect Dis. 2009 Feb 15;199(4):537-46.**

**Nascimento EJ, et al. Gene expression profiling during early acute febrile stage of dengue infection can predict the disease outcome. PLoS One. 2009 Nov 19;4(11):e7892.**

**Ng LF, Chow A, Sun YJ, Kwek DJ, Lim PL, Dimatatac F, Ng LC, Ooi EE, Choo KH, Her Z, Kourilsky P, Leo YS. IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. PLoS One. 2009;4(1):e4261.**



### c. Diagnostic de la mélioïdose septicémique :

Pankla R, et al. Genomic transcriptional profiling identifies a candidate blood biomarker signature for the diagnosis of septicemic melioidosis. *Genome Biol.* 2009;10(11):R127

- Infection par *Burkholderia pseudomallei* fréquent en Asie (4.4/100.000 en Thaïlande), jusqu'à 40 % de mortalité.
- D'autres infections causent une septicémie. Traitements antibiotiques ≠ Contrôles : non infectés, certains avec diabète de type 2 (T2D).



➤ **Les profils des patients avec sepsis sont différents des contrôles :**

**48.701 sondes → filtration → 2.785 transcrits.**

**Classification non supervisée.**

**Analyse des composants principaux : réduction à 7 groupes.**

**Annotations : « défense response » ; « immune system process » ;  
« response to stress » ; « inflammatory response ».**

**Analyse statistique : validation de 2.733 transcrits.**



➤ **Les profils des patients avec sepsis sont hétérogènes :**

**Classification non supervisée : groupes non liés aux pathogènes.**

**Analyse modulaire (module : ensemble de gènes liés fonctionnellement et d'expression coordonnée)**

➤ **Grilles de modules.**



- **Découverte d'une possible signature de 37 transcrits (33 + 4) spécifique de la mélioïdose.**

**Ajustée et vérifiée avec un autre jeu de sondes : 100 %.**

**Utilisée de façon prédictive : 80 %.**



## 2. Prévention, vaccination.

### a. Le vaccin contre la fièvre jaune (17D)

- 1 vaccin ancien (1937) remarquablement efficace.

**Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. Nat Rev Immunol. 2009 Oct;9(10):741-7.**

**Barrett AD, Teuwen DE. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? Curr Opin Immunol. 2009 Jun;21(3):308-13.**



➤ **Réponse immunitaire innée et adaptative rapide (7-10 j)**

**TLR 2, 7, 8, 9 et NK.**

**anticorps neutralisants.**

**CD4+ et CD8+ CTL.**

➤ **17D protège contre les 7 génotypes de virus (divergence ↗ 8 % aa)**

➤ **600 millions de doses.**

**Événements adverses (neurotropes, viscerotropes) rares.**

➤ **Mémoire de long terme (10 à 45 ans).**



**Querec TD et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. Nat Immunol. 2009 Jan;10(1):116-25**

➤ **15 individus vaccinés, prélèvements sanguins.**

**T0, 1, 3, 7, 21 Cytokines ? IP-10 et IL-1 $\alpha$  ↗ (idem autres flavivirus)**

**DC's ? mDC et pDC ↗**

**Monocytes (y compris CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>) ↗**

**Transcriptomes : analyses statistiques, filtrages, confirmations.**

**➔ 65 gènes modulés par la vaccination.**



➤ **Analyse des 65 gènes**

**Cinétique d'expression (pic à  $\beta 7$ )**

**Recrutement de cellules ou induction ? In vitro, 35/65 induits.**

**Ontologie, fonction**

- > **CD86** ↗ sur DC et monocytes.
- > **Réseau de gènes liés aux interférons.**
- > **Activation du complément.**



➤ **Prédiction de la réponse TCD8+**

**Retour aux données initiales → 839 gènes dont le niveau d'expression corrèle avec l'ampleur de la réponse CD8.**

**Recherche d'une signature prédictive 15 gènes, prédiction à 87 %.**

**Rôle de EIF2AK (GCN2) : régulation de la traduction dans la réponse intégrée au stress. Phosphorylation + Granules de stress.**

➤ **Prédiction de la production d'anticorps neutralisants ( $\beta$  90)**

**Même approche. Prédiction ( $\beta$ 7) à 80 %**

**Rôle de 4 gènes dont le récepteur de BLyS- BAFF**



- **La vaccination produit une signature précoce semblable à l'infection.**
- **D'autres signatures sont prédictives de l'immunogénicité (pas de la protection).**
- **L'immunité innée (précoce) conditionne l'ampleur de la réponse adaptative après vaccination de façon prédictive.**
- **Généralité des signatures pour d'autres vaccins ?**



## **b. Un vaccin contre la malaria en cours de développement**

**Vahey MT, et al. Expression of genes associated with immunoproteasome processing of major histocompatibility complex peptides is indicative of protection with adjuvanted RTS,S malaria vaccine. J Infect Dis. 2010 Feb 15;201(4):580-9.**

**Vaccin RTS, S / AS01 ou / AS02 (Adjuvants avec MPL et QS21)**

**39 volontaires : 13 protégés, 26 non protégés  
(11 retards de parasitémie).**



### **c. Les adjuvants pour la vaccination.**

**Mosca F, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29;105(30):10501-6.**

➤ **Adjuvants :**

**TLR – dépendants (CpG)**

**TLR – indépendants Alun, MFS9**

➤ **Alun et MFS9**

**améliorent l'accessibilité et la capture de l'antigène ?**

**immunostimulants ?**

**Effets modulés par CpG.**



➤ **Quadriceps de souris + Alun, MFS9, CpG, MFS9+ CpG, PBS**

|                   |                  |                        |                      |
|-------------------|------------------|------------------------|----------------------|
| <b>MFS9</b>       | <b>891 gènes</b> | <b>489 spécifiques</b> | } <b>168 communs</b> |
| <b>Alun</b>       | <b>312</b>       | <b>24</b>              |                      |
| <b>CpG</b>        | <b>387</b>       | <b>85</b>              |                      |
| <b>MFS9 + CpG</b> | <b>542</b>       | <b>176</b>             |                      |

➤ **Analyse fonctionnelle : (GO = Gene Ontology)**



➤ **Cible de MFS9 ?**

**Marqueurs précoces : Pentraxin 3 (forme longue, récepteur de certains pathogènes) et jUNB activés après 3h (transcriptome et IF)**

**Suggère que MFS9 active le muscle au site d'injection.**

**Les muscles squelettiques activés produisent des cytokines pro-inflammatoires, des chemokines, etc.**

**CpG active les muscles, mais pas l'alun.**



## **B. Microbiomes**

### **1. Problématique générale**

- **En incluant l'intestin : 100.000 milliards de symbiotes microbiens.**

**Niches et habitats distincts, mais interconnectés ?**

**Variables entre les niches ?**

**entre les individus ?**

**dans le temps chez le même individu ?**

**Rôles physiopathologique ?**

**Liens avec les systèmes de l'organisme (immunitaire, métabolique, etc. ?)**



## 2. Les microbiomes de la peau.

- **Importance de définir la « normalité » vs. pathologies de la peau (sites spécifiques)**

**dermatite atopique.**

**psoriasis.**

**traitement antibiotiques et réactions atopiques.**

**➔ « cartographie » du corps.**



## ➤ **Le microbiome de la paume de la main**

**Fierer N, et al. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Nov 18;105(46):17994-9.**

➤ **51 volontaires et > 300.000 séquences d'ARN 16S (3000 séquences / paume).**

➤ **Plus de 150 phylotypes (diversité comparable à l'œsophage, la bouche, sites spécifiques de l'intestin).**

**3 phyla dominants.**

**Différences hommes / femmes (phylo et diversité) (pH?).**

**Variabilité considérable.**



➤ **Diversité topographique et temporelle :**

**Grice EA, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. Science. 2009 May 29;324(5931):1190-2.**

**Costello EK, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science. 2009 Dec 18;326(5960):1694-7**

**Prélèvements : 20 sites sur une dizaine de volontaires,  
à 2 ou plusieurs périodes.**

**Méthode : séquençage massif de l'ARN 16S  
(de 10.000 à 1.000.000 de séquences)**



- **Une vingtaine de phyla bactériens, dont 4 dominants (92 %) Actinobactéries, Firmicutes, Protéobactéries, Bactéroidetes.**

**Habitats distincts chez la même personne.**

**Habitats symétriques plutôt semblables.**

**Relative stabilité dans le temps.**

**Plusieurs grandes catégories biogéographiques (zones sèches, humides, sébacées).**

**Différences interpersonnelles > intra personnelles.**

**Expériences de transplantation de microbiomes localisés**

**➔ Evolution des transplants vers la niche réceptive.**



### **3. La microbiome intestinal**

#### **a. Composition et stabilité**

**Hartman AL, et al. Human gut microbiome adopts an alternative state following small bowel transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Oct 6;106(40):17187-92.**

**Patients dont l'intestin est trop court pour absorber les nutriments.**

**Transplantation sans décontamination → nouvel organe avec son microbiome.**

**Ileostomie (suivi de l'allogreffe) et prélèvements d'effluents iliaques (≠ fécaux)**

**17 transplantés ~ 15 x 17 prélèvements, PCR, séquençage ARN 16S qPCR sur les 4 populations bactériennes majeures.**



**Lactobacilles et Entérobactéries > bactéroïdes et clostridia  
(anaérobiques facultatifs) (strictement anaérobiques)**

**Fermeture de l'iléostomie, 6 patients prélevés par coloscopie.**

**Iléostomies sans transplantation (5 patients).**

**Métabolome (spectrométrie de masse) 63 des 345 métabolites  
détectés différents.**



## **b. Obésité, maladies métaboliques et inflammatoires.**

**Rôle de la flore intestinale : capacités métaboliques,  
extraction d'énergie aliments (polysaccharides) non digestibles.**

**Composition des microbiomes corrélée à l'obésité et au diabète  
chez la souris et chez l'homme.**

**Pourrait affecter l'efficacité de la récolte d'énergie et son stockage.**



Turnbaugh PJ, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480-4.

- Cohorte de jumeaux, mono- (31) et di- (23) zygotiques et de leurs mères. 154 individus, prélèvements fécaux, analyse ARN 16S (~ 2 millions de séquences et 25 mégabases de séquences pour certains microbiomes)





- **6 familles (3 jumeaux obèses ou maigres + mères)**  
**18 microbiomes (2 gigabases) + base de données de 44 microbiomes**

**Recherche des séquences de CAZymes = carbohydrate active enzymes**  
**156 familles de séquences.**

**2.6 % des microbiomes (217.000 séquences) assignées à ces gènes.**

- ➔ **Noyau fonctionnel assez stable, en dépit des fluctuations dans les compositions phylogénétiques (ARN 16S).**



➤ **Analyse des microbiomes « core »**

**Identification de 383 gènes différents entre obèses et minces.**

**Corrèle avec les différences taxonomiques : 75 % des gènes fréquents chez les obèses proviennent d'Actinobactéries.**

**Jumeaux monozygotes : similarités idem pour di-zygotes.**

➔ **Le microbiome humain est mieux caractérisé par un ensemble de gènes partagés que de micro-organismes.**



## c. Régulation des réponses inflammatoires

Maslowski KM, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009 Oct 29;461(7268):1282-6.

- La flore intestinale normale pourrait prévenir le développement de maladies inflammatoires. Rôle des acides gras à chaîne courte (SCFA) (passent dans le sang).
  
- Colites ulcéraives corrélées à :  
  
modifications de la flore (bifido bacterium, Batérioides)  
SCFA ↘ (SCFA ↗ bénéfice clinique)
  
- GPR43 = récepteur de SCFA.



- **Induction d'une colite par DSS Souris « germ-free » > normale. inflammation exacerbée, contrôlée par re-colonisation.**

**SCFA (acétate et propionate) activent GPR3.**

**Transcription de GPR43 (homme et souris) active dans les neutrophiles et les éosinophiles.**

**Souris Gpr43 KO : inflammation exacerbée de l'intestin.**

**Induction d'arthrite rhumatoïde et d'asthme chez la souris KO.**

- **Réponse immunitaire périphérique**
- **Réponse clinique plus sévère.**



### 3. Conclusions

**Coévolution des bactéries commensales et du système immunitaire.**

**Lien avec le métabolisme**

**Jansson J, et al. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. PLoS One. 2009 Jul 28;4(7):e6386.**

➤ **Réinterprétation de certaines infections : *Helicobacter pylori*.**

**Dorer MS, et al. Helicobacter pylori's unconventional role in health and disease. PLoS Pathog. 2009 Oct;5(10):e1000544.**

**Effet protecteur d'*H.pylori* contre maladies de l'œsophage.**

**Microbiome de l'estomac.**

**Eradication d'*H.pylori* ?**